



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

**Caraterização fitoquímica e determinação da
atividade biológica de extratos de cascas de *Salix
salviifolia***

Mariana Filipa Mendes Lucas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Química Medicinal
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Professora Doutora Maria Isabel Guerreiro da Costa Ismael
Co-orientador: Professora Doutora Ana Paula Coelho Duarte

Covilhã, outubro de 2017

Agradecimentos

Começo por agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Isabel Ismael, e à minha co-orientadora, Professora Doutora Ana Paula Duarte, pelas suas orientações e por todo o apoio prestado na realização desta dissertação. Em especial, à Professora Isabel Ismael, por toda a compreensão, paciência, conselhos e desabafos, o seu apoio foi fundamental para a concretização, evolução e conclusão deste trabalho.

Ao Professor Doutor José Albertino Figueiredo, o meu agradecimento pelas suas orientações e disponibilidade e por todo o auxílio prestado sempre que o solicitei.

Quero ainda agradecer de forma especial ao Professor Doutor Jesus Rodilla pelo seu apoio, disponibilidade e por todos os ensinamentos transmitidos e ajuda prestada, sem a qual não era possível a realização de algumas etapas deste trabalho.

Agradeço ao Doutor Luís Matias por toda a disponibilidade, boa disposição e paciência com a água.

Agradecer também ao Ângelo Luís e à Sofia Pombal por toda a disponibilidade e ajuda prestada na realização de algumas técnicas.

À D. Dulce e à D. Ana agradeço a simpatia, o carinho e a disponibilidade demonstrada durante o meu percurso. Ao Sr. João, obrigada pela sua disponibilidade e boa disposição.

O meu reconhecimento e agradecimento aos meus colegas de laboratório por todo seu apoio, ajuda, paciência e troca de ideias. De forma especial aos que me acompanharam nas horas mais difíceis, onde o desespero imperava perante as colunas intermináveis e os resultados teimavam em aparecer.

Aos meus amigos, o meu enorme e sentido obrigada por todo apoio e incentivo, pela palavra amiga, pelos momentos de partilha e descontração e por compreenderem as minhas ausências. De forma particular aos que estiveram presentes durante este árduo ano de trabalho, pois sem eles, a sua força e apoio incondicional teria sido bem mais difícil.

À minha família do coração, cujo o apoio é mais que incondicional e sem o qual não teria sido possível a realização deste trabalho. Todas as palavras são poucas para expressar o meu profundo agradecimento por todo o apoio, interajuda, companheirismo, conselhos e paciência, que simplesmente eu não pedi, mas que vocês fizeram questão de me dar, sobretudo quando eu mais precisava. Aos quatro o meu eterno obrigada por tudo, simplesmente não há palavras para expressar a minha gratidão.

Por fim, mas não menos importante, quero agradecer a toda a minha família, que me acompanha desde de sempre e sem a qual não seria possível ter chegado até aqui. Obrigada por todo incentivo e motivação e por acreditarem em mim.

À minha mãe, por todo o exemplo de coragem e determinação. Ao meu pai, pelo seu apoio incansável. Ao meu irmão, por todo o carinho e preocupação. A eles, o meu maior agradecimento, pois são os responsáveis pela pessoa que sou e pela minha determinação. Obrigada por todas palavras de conforto, pela compreensão, pelo carinho, por estarem sempre presentes, mas sobretudo por acreditarem em mim e por acreditarem que era possível concretizar os meus objetivos. Sem vocês e o vosso apoio não teria consigo. Obrigada pelo exemplo que me transmitem diariamente.

A vida faz mais sentido quando partilhada!

Obrigada.

Mariana Filipa Mendes Lucas

Resumo

Desde a antiguidade, que as plantas desempenham um papel fundamental na medicina, sendo a base dos tratamentos tradicionais. Assim, grande parte do conhecimento atual sobre elas deve-se à medicina tradicional. Tendo em conta a sua importância, surgiu a necessidade de se realizarem estudos cada vez mais aprofundados destas, de forma a isolar-se os seus constituintes e as suas potenciais atividades biológicas.

Neste estudo foram investigados dois extratos provenientes de cascas de *Salix salviifolia* subsp. *salviifolia*, também conhecida como salgueiro branco, obtidos por extração com *n*-hexano e com etanol/água (80/20). Essencialmente, o objetivo foi fracionar e caraterizar quimicamente estes extratos e avaliar a sua atividade biológica por determinação da sua atividade antioxidante.

O estudo foi iniciado com o extrato de etanol/água, tendo-se realizado diversos fracionamentos que se demonstraram ineficazes, o que levou à adoção da estratégia dos grupos protetores. A estratégia mais eficaz acabou por ser a acetilação do extrato bruto, onde foi possível a identificação estrutural, por RMN (Ressonância Magnética Nuclear), de três produtos: 3-Acetil-3-hidroxi-6-metil-piran-2,4-diona; 3-Acetil-3,6-dimetil-piran-2,4-diona; Ácido (*E*)-2-acetil-3-hidroxi-but-2-enóico. Por análise do extrato acetilado, no GC-MS (cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa), foram identificados monossacáridos e dissacáridos acetilados e alguns glicósidos. Minoritariamente, também foram identificados esteroides, lactonas, furanocumarinas e salicoilsalicina. Este extrato demonstrou possuir um elevado conteúdo de fenóis totais e um teor relativamente baixo de flavonoides.

O extrato de *n*-hexano sofreu um processo de separação, o qual originou três fases, que foram estudadas separadamente e analisadas por GC-MS. Esta análise permitiu identificar alguns compostos nele presentes, concluindo-se que os terpenoides são os compostos maioritários. Para além destes, também foram identificados hidrocarbonetos e ácidos gordos esterificados com um grupo metilo.

Quanto à avaliação da atividade biológica, a sua determinação foi efetuada pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico. Esta avaliação apenas foi realizada para o extrato de etanol/água. O extrato demonstrou uma atividade antioxidante muito forte, pelo método de DPPH. Pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, o extrato apresentou um poder antioxidante menor.

Palavras-chave

Salix salviifolia subsp. *salviifolia*, extrato etanol/água, extrato *n*-hexano, caraterização fitoquímica, atividade antioxidante.

Abstract

Since antiquity, plants have played a key role in medicine, being the basis of traditional treatments. Thus, almost all the current knowledge about them is due to traditional medicine. Once they are important, there was a need to develop more depth studies, to isolate their constituents and their potential biological activities.

Therefore, in this study were analysed two extracts from barks from *Salix salviifolia* subsp. *salviifolia*, also known as white willow, obtained by extraction with *n*-hexane and with ethanol/water (80/20). Essentially, the objective was to fractionate and chemically characterize these extracts and evaluate their biological activity by determining their antioxidant activity.

This study was started with the ethanol/water extract, in which were performed several fractionations, which proved to be ineffective. To solve this problem was adopted a strategy, which consisted in the use of the protective groups. The most effective strategy turned out to be the acetylation of the crude extract, where it was possible to identify three structural products by NMR (Nuclear Magnetic Resonance): 3-Acetyl-3-hydroxy-6-methyl-pyran-2,4-dione; 3-Acetyl-3,6-dimethyl-pyran-2,4-dione; (*E*)-2-Acetyl-3-hydroxybut-2-enoic acid. By the analysis of the acetylated extract, by GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry), were identified several acetylated monosaccharides and disaccharides and some glycosides. In minority quantity have also been identified some steroids, lactones, furanocoumarins and salicylsalicin. This extract has been shown to have a high content of total phenols and a relatively low content of flavonoids.

The *n*-hexane extract underwent a separation process, which gave rise to three phases, which were studied separately and analysed by GC-MS. This analysis allowed to identify some compounds present in the extract, concluding that the terpenoids are the major compounds. In addition to these, hydrocarbons and methyl esters of fatty acids have also been identified.

As for the biological activity evaluation, it was determinate by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method and the β -carotene/linoleic acid system. This evaluation was only performed for the ethanol/water extract. By the DPPH method, this extract showed a very strong antioxidant activity and by the β -carotene/linoleic acid system, the extract had a lower antioxidant power.

Keywords

Salix salviifolia subsp. *salviifolia*, ethanol/water extract, *n*-hexane extract, phytochemical characterization, antioxidant activity.

Índice

Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas	x
Lista de Acrónimos, Abreviaturas e Símbolos	xii
1. Introdução	1
1.1. Género <i>Salix</i>	2
1.2. <i>Salix salviifolia</i> subsp. <i>salviifolia</i>	3
1.3. Constituintes das plantas	3
1.3.1. Glúcidos	3
1.3.2. Lípidos	4
1.3.3. Terpenoides	5
1.3.4. Compostos fenólicos.....	7
1.3.4.1. Ácidos fenólicos e fenóis.....	7
1.3.4.2. Flavonoides	8
1.3.4.3. Cumarinas	10
1.3.5. Grupos protetores	11
1.3.6. Avaliação biológica	11
1.3.6.1. Atividade antioxidante - Método do DPPH	13
1.3.6.2. Atividade antioxidante - Sistema β -caroteno/ácido linoleico	14
2. Parte experimental.....	15
2.1. Métodos gerais.....	15
2.2. Extratos	16
2.3. Extrato etanol/água (80/20).....	17
2.3.1. Determinação dos fenóis totais	17
2.3.2. Determinação dos flavonoides totais	18
2.3.3. Fracionamento do extrato bruto	19
2.3.4. Metilação do extrato bruto	20
2.3.5. Acetilação do extrato bruto sem catalisador	20
2.3.6. Acetilação do extrato bruto com catalisador	21
2.4. Extrato n-hexano	22
2.4.1. Processo de separação.....	22
2.4.2. Fracionamento da fase superior	23
2.4.3. Saponificação	23
2.4.4. Metilação das frações ácidas	25
2.5. Determinação da atividade biológica.....	26
2.5.1. Atividade antioxidante - Método do DPPH.....	26
2.5.2. Atividade antioxidante - Sistema β -caroteno/ácido linoleico	28
3. Resultados e Discussão.....	30

3.1. Extrato etanol/água (80/20).....	30
3.1.1. Quantificação dos fenóis totais	30
3.1.2. Quantificação dos flavonoides totais	31
3.1.3. Fracionamento do extrato bruto	31
3.1.4. Metilação do extrato bruto	34
3.1.5. Acetilação do extrato bruto sem catalisador	35
3.1.6. Acetilação do extrato bruto com catalisador	36
3.2. Extrato n-hexano	43
3.2.1. Processo de separação	43
3.2.2. Fracionamento da fase superior	43
3.2.3. Saponificação	48
3.2.4. Metilação das frações ácidas	49
3.3. Atividade biológica	51
3.3.1. Atividade antioxidante - Método do DPPH.....	52
3.3.2. Atividade antioxidante - Sistema β -caroteno/ácido linoleico	54
4. Conclusões e Perspetivas futuras	56
Comunicações e Publicações	62
Anexos.....	73
Anexo I - Espectros de RMN	73
Anexo II - Atividade antioxidante - Método do DPPH	82

Lista de Figuras

Figura 1 <i>Salix salviifolia</i> subsp. <i>salviifolia</i> em floração. ¹³	3
Figura 2 Exemplo de uma aldose (D-Glucose) e de uma cetose (D-Fructose), na forma de cadeia aberta. ¹	4
Figura 3 Exemplo de um ácido gordo saturado (A), o ácido palmítico. Estrutura base de alguns lípidos: glicerol (B) e triglicéridos (C), onde R ₁ , R ₂ e R ₃ podem ser cadeias saturadas ou insaturadas. ^{1,16}	5
Figura 4 Estrutura do isopreno, considerada como a unidade estrutural dos terpenoides, e estrutura do isopentano. ¹⁷	5
Figura 5 Estrutura do esqualeno e núcleo de um derivado do ciclopentano-per-hidrofenantreno, com designação dos anéis e respetiva numeração. ^{1,17}	6
Figura 6 Estrutura do carotenoide licopeno, de onde derivam os restantes carotenoides. ¹	7
Figura 7 Estrutura do ácido benzoico e do ácido cinâmico, dos quais derivam a maioria dos ácidos fenólicos. ¹	8
Figura 8 Estrutura básica da flavona e respetiva identificação dos anéis e numeração dos carbonos. ^{1,19}	9
Figura 9 Estruturas básicas das diversas classes de flavonoides: flavona, flavonol, flavanona, isoflavona, isoflavonol, isoflavanona, antiocianidina e catequina. ^{1,19}	10
Figura 10 Estrutura química da cumarina (5,6-benzo-2-pirona), esqueleto básico desta classe. ¹	10
Figura 11 Reação entre o radical livre DPPH e o composto antioxidante (RH), o que resulta na formação da difenil-picrilhidrazina. ³⁰	14
Figura 12 Curva de calibração do ácido gálico para determinação dos fenóis totais, obtida a partir da média das leituras das absorvâncias em triplicado.	18
Figura 13 Curva de calibração da quercetina para determinação dos flavonoides totais, obtida a partir da média das leituras das absorvâncias em triplicado.	19
Figura 14 Organograma do procedimento experimental após saponificação de B1 e denominação das frações.....	24
Figura 15 Organograma do procedimento experimental após saponificação de B2 e denominação das frações.....	25
Figura 16 Curva de calibração do DPPH para determinação da atividade antioxidante, obtida a partir da média das leituras das absorvâncias em triplicado.	27
Figura 17 Estrutura da 3-Acetil-3-hidroxi-6-metil-piran-2,4-diona e numeração das posições, atribuída para a análise durante a identificação estrutural.	39
Figura 18 Estrutura do Ácido (E)-2-acetil-3-hidroxibut-2-enóico e numeração das posições, atribuída para a análise durante a identificação estrutural.	40
Figura 19 Estrutura da 3-Acetil-3,6-dimetil-piran-2,4-diona e numeração das posições, atribuída para a análise durante a identificação estrutural.	41

Figura 20 Representação gráfica da % I em função da concentração do extrato de etanol/água na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.	52
Figura 21 Representação gráfica da % I em função da concentração do extrato de etanol/água na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,1242 mM.	53
Figura 22 Representação gráfica da % I em função da concentração do extrato de etanol/água na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,2000 mM.	53
Figura 23 Atividade antioxidante do extrato e do padrão BHT, determinada pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico. Os resultados foram obtidos a partir da média das leituras das absorvâncias em duplicado.....	55
Figura 24 Representação gráfica da % I em função da concentração do padrão rutina na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.	82
Figura 25 Representação gráfica da % I em função da concentração do padrão rutina na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,1242 mM.	83
Figura 26 Representação gráfica da % I em função da concentração do padrão rutina na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,2000 mM.	83
Figura 27 Representação gráfica da % I em função da concentração do padrão trolox na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.	84
Figura 28 Representação gráfica da % I em função da concentração do padrão trolox na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,1242 mM.	85
Figura 29 Representação gráfica da % I em função da concentração do padrão trolox na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,2000 mM.	85
Figura 30 Representação gráfica da % I em função da concentração do padrão ácido gálico na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.	86
Figura 31 Representação gráfica da % I em função da concentração do padrão ácido gálico na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,1242 mM.	87
Figura 32 Representação gráfica da % I em função da concentração do padrão ácido gálico na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,2000 mM.	87

Lista de Tabelas

Tabela 1 Concentrações das soluções metanólicas de DPPH utilizadas na construção da curva de calibração.	26
Tabela 2 Classificação de uma amostra quanto ao tipo de atividade antioxidante demonstrado.	28
Tabela 3 Registo das massas das frações de I a V, da massa total de extrato bruto submetido a fracionamento (total de extrato) e da massa total obtida nas frações (total das frações). ...	32
Tabela 4 Síntese das frações obtidas, da sua constituição e massa, após o fracionamento do extrato e o subfracionamento das frações IV e V.	33
Tabela 5 Compostos detetados na amostra de extrato bruto, após metilação com diazometano, por GC-MS e os tempos de retenção (T.R.) e abundância relativa (%), respetivos.	34
Tabela 6 Frações combinadas obtidas na CC e respetivas massas e massa total de produtos recolhidos nas frações.	35
Tabela 7 Comparação da composição química, abundância relativa e tempos de retenção das componentes das amostras Acetilação I e Acetilação II. (t - traços: componentes vestigiais)	37
Tabela 8 Constituição de cada fração resultante da Acetilação I e Acetilação II e respetiva massa. A massa total de produtos recolhidos nas frações também se encontra indicada.	38
Tabela 9 Dados de RMN de ^1H (δ em ppm, multiplicidade), de RMN de ^{13}C (δ ppm) e correlações HSQC e HMBC para o composto 3-Acetil-3-hidroxi-6-metil-piran-2,4-diona.	40
Tabela 10 Dados de RMN de ^1H (δ em ppm, multiplicidade), de RMN de ^{13}C (δ ppm) e correlações HSQC e HMBC para o composto Ácido (E)-2-acetil-3-hidroxibut-2-enóico.	41
Tabela 11 Dados de RMN de ^1H (δ em ppm, multiplicidade), de RMN de ^{13}C (δ ppm) e correlações HSQC e HMBC para o composto 3-Acetil-3,6-dimetil-piran-2,4-diona.	42
Tabela 12 Fases obtidas e respetivas massas.	43
Tabela 13 Frações combinadas obtidas na CC e respetivas massas e massa total de produtos recolhidos nas frações.	43
Tabela 14 Compostos detetados na fração 6-8, resultante do fracionamento da fase superior, por GC-MS e respetivos tempos de retenção (T.R.) e abundância relativa (%).	45
Tabela 15 Compostos detetados na fração 9-12, resultante do fracionamento da fase superior, por GC-MS e respetivos tempos de retenção (T.R.) e abundância relativa (%).	45
Tabela 16 Compostos detetados na fração 13-15, resultante do fracionamento da fase superior, por GC-MS e respetivos tempos de retenção (T.R.) e abundância relativa (%).	46
Tabela 17 Compostos detetados na fração 16-21, resultante do fracionamento da fase superior, por GC-MS e respetivos tempos de retenção (T.R.) e abundância relativa (%).	46
Tabela 18 Compostos detetados na fração 22-23, resultante do fracionamento da fase superior, por GC-MS e respetivos tempos de retenção (T.R.) e abundância relativa (%).	47
Tabela 19 Compostos detetados na fração 39-49, resultante do fracionamento da fase superior, por GC-MS e respetivos tempos de retenção (T.R.) e abundância relativa (%).	47

Tabela 20 Frações obtidas após tratamento da fase B1 e B2 e respectivas massas. A massa total recolhida de cada fase também foi registada.	48
Tabela 21 Comparação da composição química, abundância relativa e tempos de retenção das componentes das frações neutra B1 e neutra B2.	48
Tabela 22 Comparação da composição química, abundância relativa e tempos de retenção das componentes das frações ácida B1 e ácida B2.....	50
Tabela 23 Parâmetros IC ₅₀ e AAI do extrato etanol/água, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.....	52
Tabela 24 Parâmetros IC ₅₀ e AAI do extrato etanol/água, para a concentração de DPPH de 0,1242 mM.....	53
Tabela 25 Parâmetros IC ₅₀ e AAI do extrato etanol/água, para a concentração de DPPH de 0,2000 mM.....	54
Tabela 26 Resumo dos parâmetros IC ₅₀ e AAI (média ± desvio médio) e classificação da atividade antioxidante para o extrato etanol/água para padrões rutina, trolox e ácido gálico.	54
Tabela 27 Parâmetros IC ₅₀ e AAI da rutina, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.	82
Tabela 28 Parâmetros IC ₅₀ e AAI da rutina, para a concentração de DPPH de 0,1242 mM.	83
Tabela 29 Parâmetros IC ₅₀ e AAI da rutina, para a concentração de DPPH de 0,2000 mM.	84
Tabela 30 Resumo dos parâmetros IC ₅₀ e AAI e classificação da atividade antioxidante da rutina.	84
Tabela 31 Parâmetros IC ₅₀ e AAI do trolox, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.	84
Tabela 32 Parâmetros IC ₅₀ e AAI do trolox, para a concentração de DPPH de 0,1242 mM.	85
Tabela 33 Parâmetros IC ₅₀ e AAI do trolox, para a concentração de DPPH de 0,2000 mM.	86
Tabela 34 Resumo dos parâmetros IC ₅₀ e AAI e classificação da atividade antioxidante do trolox.	86
Tabela 35 Parâmetros IC ₅₀ e AAI do ácido gálico, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.	86
Tabela 36 Parâmetros IC ₅₀ e AAI do ácido gálico, para a concentração de DPPH de 0,1242 mM.	87
Tabela 37 Parâmetros IC ₅₀ e AAI do ácido gálico, para a concentração de DPPH de 0,2000 mM.	88
Tabela 38 Resumo dos parâmetros IC ₅₀ e AAI e classificação da atividade antioxidante do ácido gálico.....	88

Lista de Acrônimos, Abreviaturas e Símbolos

δ	desvio(s) químico(s) em RMN
λ	comprimento de onda
% I	percentagem de inibição
AAI	índice de atividade antioxidante, do inglês <i>Antioxidant Activity Index</i>
ADN	ácido desoxirribonucleico
aq.	aquosa(o)
ATR	refletância total atenuada, do inglês <i>Attenued Total Reflectance</i>
BHT	butil-hidroxitolueno
CC	cromatografia em coluna
CCF	cromatografia em camada fina
Cq	carbono quaternário
DEPT	intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização, do inglês <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMSO- d_6	dimetilsulfóxido hexadeuterado
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG	equivalentes de ácido gálico
EQ	equivalentes de quercetina
FTIR	infravermelho por transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform InfraRed</i>
GC-MS	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, do inglês <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
HMBC	correlação heteronuclear a múltiplas ligações, do inglês <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	correlação heteronuclear a uma ligação, do inglês <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IC ₅₀	concentração para a qual se verifica 50% de inibição, do inglês <i>inhibitory concentration</i>
LOO \cdot	radical peróxido do ácido linoleico
min.	minuto(s)
ND	não definido(s)
NI	não identificado(s)
ppm	partes por milhão
RMN	ressonância magnética nuclear

RMN de ^1H	ressonância magnética nuclear de próton
RMN de ^{13}C	ressonância magnética nuclear de carbono
RNS	espécies reativas de azoto, do inglês <i>reactive nitrogen species</i>
ROS	espécies reativas de oxigénio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
T.R.	tempo de retenção
Trolox	ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-3,4-dihidrocromeno-2-carboxílico
s	singleto
subsp.	subespécie
t	traços
UV	ultravioleta

1. Introdução

Durante milhares de anos, as plantas foram a base dos medicamentos tradicionais um pouco por todo o mundo, sendo os principais agentes terapêuticos utilizados pelo Homem. As primeiras civilizações aperceberam-se que para além das plantas comestíveis existiam outras com potencial para serem utilizadas no combate de doenças, com maior ou menor toxicidade. Apesar da evolução da medicina, a medicina tradicional continua a desempenhar um papel importante e as plantas continuam a ser uma grande fonte de compostos para o desenvolvimento de novos fármacos.¹

Como fonte de agentes terapêuticos, as plantas podem ser utilizadas para diferentes objetivos, nomeadamente podem isolar-se compostos bioativos para aplicação direta como fármacos, como por exemplo a morfina, mas também podem produzir-se novos compostos bioativos com uma estrutura nova ou conhecida, para hemisíntese de forma a obter-se entidades químicas patenteáveis com maior atividade e/ou menor toxicidade.²

Atualmente, utilizam-se os compostos puros extraídos das plantas, responsáveis pela ação farmacológica, e não apenas os extratos brutos destas, para aplicações terapêuticas. Assim, para se conhecer os componentes estruturais com interesse medicinal efetua-se uma bateria de testes, de forma a concluir o que realmente leva a essa atividade e a sua extensão.¹

Quanto à obtenção dos extratos para estudos, geralmente não se utiliza a planta na totalidade, mas sim partes individuais. A grande maioria das pesquisas incide nas raízes, folhas, flores, frutos ou sementes da planta, podendo até comparar-se a constituição e/ou atividade das diferentes partes. Outro alvo de estudo é a variação da constituição de cada parte da planta ao longo do ano, uma vez que a variação dos diferentes fatores ambientais influencia o tipo de compostos presentes e a sua quantidade.

A importância das plantas na área da medicina leva a que se efetuem cada vez mais estudos sobre a flora que nos rodeia, recaindo sobretudo em espécies em que as informações são escassas ou nulas. Por exemplo, apesar de existirem vários pesquisas concentrados no género *Salix* e nas suas propriedades medicinais, não existem estudos sobre o *Salix salviifolia* subsp. *salviifolia*.

O presente estudo pretende caracterizar quimicamente e fracionar os extratos obtidos por refluxo com *n*-hexano e com etanol/água (80/20), ambos de cascas de *Salix salviifolia* subsp. *salviifolia*, com a finalidade de avaliar a sua atividade biológica, por determinação da atividade antioxidante dos extratos brutos.

1.1. Género *Salix*

As espécies do género *Salix* pertencem à família *Salicaceae* e são árvores ou arbustos, vulgarmente designados por salgueiros, que geralmente apresentam ramos flexíveis. Estas espécies apresentam um rápido crescimento, têm facilidade para se enraizarem e disseminam-se facilmente. O género *Salix* apresenta alguns problemas taxonómicos e de nomenclatura, devido à grande variabilidade morfológica das espécies, o que dificulta o seu estudo e identificação.³

Desde a antiguidade que os salgueiros são utilizados para diferentes finalidades, como domésticas, agricultura e artesanato. Para além destas aplicações, podem ainda ser utilizados para fins medicinais, uma vez que a casca, as flores e as folhas de algumas espécies contêm salicina, que é o precursor do ácido acetilsalicílico (aspirina), o qual é produzido sinteticamente e não extraído da casca do salgueiro. A casca e as folhas dos salgueiros, para além de salicina, também contêm outros compostos como outros glicósidos fenólicos, taninos e flavonoides. A sua composição varia significativamente dependendo da espécie.^{1,3}

Diversas espécies de *Salix* têm sido alvo de estudo, os quais se concentram sobretudo na caracterização e identificação fitoquímica e nas suas aplicações medicinais. Por exemplo, num estudo conduzido por Malterud e colaboradores⁴ conclui-se que os flavonoides presentes na madeira de *Salix caprea* possuíam propriedades antifúngicas. Enquanto que Alam e colaboradores⁵ demonstraram que o extrato de etanol proveniente de flores de *Salix caprea* possui uma potente atividade antioxidante.^{4,5} Para além destes estudos existem outros que reportam propriedades anti-inflamatórias, antipiréticas, analgésicas, sedativas, antidiabéticas, entre outras, e reforçam a identificação de compostos presentes nas diversas partes constituintes da planta.⁶⁻⁸

Num estudo realizado na Turquia, com o *Salix aegyptiaca*, foi determinada a atividade antioxidante de extratos de diferentes partes da planta, obtidos com diferentes solventes, e identificaram-se os compostos fenólicos presentes. Como resultado, concluíram que o extrato etanólico da casca apresentava a maior atividade antioxidante e que as partes aéreas desta espécie detêm grandes quantidades de fenóis e flavonoides, o que indica que os extratos podem ser utilizados como fonte de antioxidante para a saúde.⁹

O *Salix suberrata*, o *Salix glandulosa*, o *Salix purpurea*, o *Salix daphnoides*, entre outros, foram e continuam a ser outras espécies alvo de estudos.¹⁰⁻¹²

1.2. *Salix salviifolia* subsp. *salviifolia*

A espécie *Salix salviifolia* subsp. *salviifolia* é vulgarmente conhecida como Salgueiro-branco, Borrazeira-branca e Borrazeira-branca-setentrional. Esta espécie é endémica da Península Ibérica e em Portugal Continental encontra-se amplamente distribuída nas regiões norte e centro. Esta é uma planta autóctone deste território. As árvores desta espécie preferem enraizar-se em locais húmidos, elegendo as condições oferecidas pelos cursos de água como as ideais. A sua época de floração compreende os meses de fevereiro, março e abril (Figura 1).^{13,14}



Figura 1 *Salix salviifolia* subsp. *salviifolia* em floração.¹³

1.3. Constituintes das plantas

1.3.1. Glúcidos

Os glúcidos são compostos orgânicos que resultam do metabolismo primário das plantas e ocupam uma posição central no reino vegetal, uma vez que fazem parte da constituição dos componentes estruturais das plantas. Para além da função estrutural, estes compostos estão envolvidos na fotossíntese, são uma fonte importante de energia no processo respiratório, são uma das principais reservas energéticas e participam no transporte de energia.^{1,15,16}

O termo glúcidos compreende os compostos que possuem aldeídos ou cetonas alifáticos com álcoois poli-hidroxilados, sendo designados por aldoses e cetoses, respetivamente (Figura 2). Estes compostos obedecem à fórmula empírica $C_n(H_2O)_n$.¹

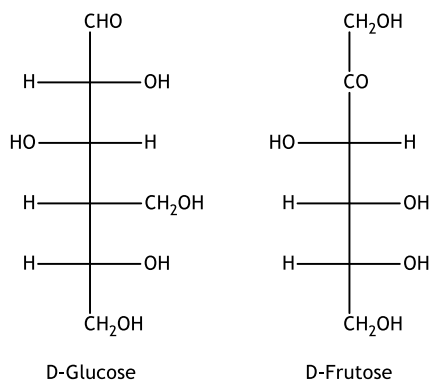


Figura 2 Exemplo de uma aldose (D-Glucose) e de uma cetose (D-Fructose), na forma de cadeia aberta.¹

Com base no tamanho molecular, os glúcidos podem ser divididos essencialmente em três grupos: os monossacáridos, os oligossacáridos e os polissacáridos. Os monossacáridos são unidades simples (oses), não podem ser hidrolisados em subunidades menores e podem ser encontrados sob duas formas de estrutura diferentes, cadeia aberta ou cadeia fechada (cíclica). A ciclização pode ocorrer no carbono da posição 4 ou 5, formando anéis de cinco (furanoses) ou seis membros (piranoses). Os oligossacáridos são constituídos por 2 a 9 oses unidas por ligações glicosídicas e podem sofrer hidrólise em subunidades menores. Os polissacáridos possuem mais de 10 oses na sua constituição e também podem sofrer hidrólise em subunidades menores.^{1,16}

Os glúcidos que por hidrólise originam outros compostos para além das oses são designados por heterósidos (ósidos). Os resíduos não glucídicos denominam-se aglicona.^{1,16}

1.3.2. Lípidos

Os lípidos são substâncias do metabolismo primário e desempenham funções de proteção, reserva energética ou revestimento. Estes compostos são derivados de ácidos gordos, que resultam da sua esterificação com um álcool ou poliálcool. Os ácidos gordos são ácidos carboxílicos de cadeia linear ou ramificada constituída por quatro ou mais átomos de carbono, que geralmente se encontram em número par, podendo ser saturados ou insaturados com uma ou mais ligações duplas.^{1,16}

De acordo com a sua composição, os lípidos podem ser divididos em dois grupos: complexos e simples. Os lípidos complexos apresentam na sua composição átomos de carbono, hidrogénio, oxigénio, azoto e/ou fósforo, enquanto os lípidos simples apenas são constituídos por carbono, hidrogénio e oxigénio.¹

Os lípidos simples podem ser subdivididos em glicéridos, céridos e estéridos, de acordo com a estrutura dos álcoois esterificados. Os glicéridos (acilgliceróis) derivam da esterificação de ácidos gordos com o glicerol e desempenham sobretudo a função de reserva de energia. Dentro

desta classe encontram-se os triglicéridos que são os lípidos mais abundantes na Natureza e são caracterizados por os três grupos hidroxilo do glicerol se apresentarem esterificados (Figura 3). Os céridos resultam da esterificação de álcoois alifáticos de peso molecular médio e elevado. Os estéridos são originados pela esterificação dos ácidos gordos com esteróis. Os esteróis são álcoois com ciclopentano-per-hidrofenantreno na sua base estrutural e no reino vegetal adquirem a denominação de fitoesteróis.^{1,16}

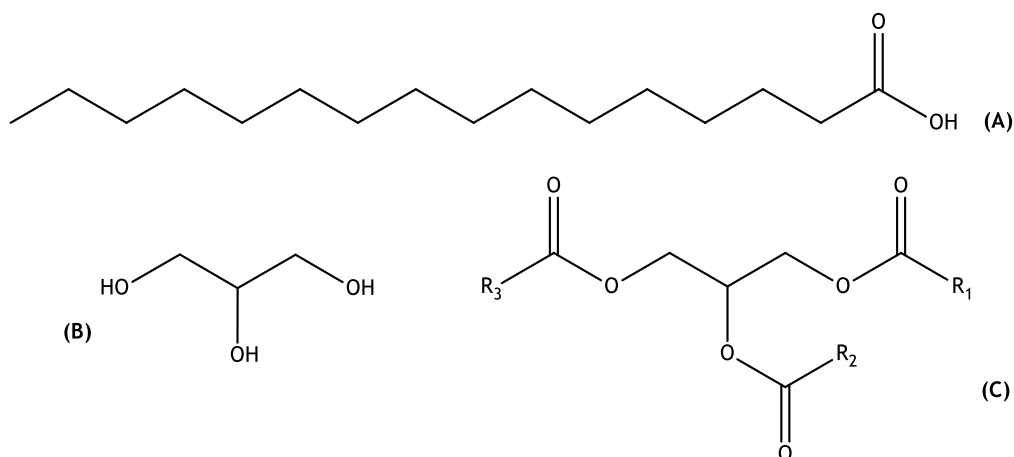


Figura 3 Exemplo de um ácido gordo saturado (A), o ácido palmítico. Estrutura base de alguns lípidos: glicerol (B) e triglicéridos (C), onde R₁, R₂ e R₃ podem ser cadeias saturadas ou insaturadas.^{1,16}

1.3.3. Terpenoides

O termo terpenos/terpenoides abrange uma grande variedade de metabolitos secundários constituintes das plantas, uma vez que se refere a todos os compostos que derivam da molécula de isopreno, que é constituída por cinco átomos de carbono. Estes compostos são hidrocarbonetos, cuja a estrutura pode ser hipoteticamente derivada do isopreno, originando estruturas que podem ser divididas em unidades de isopentano (Figura 4).^{16,17}

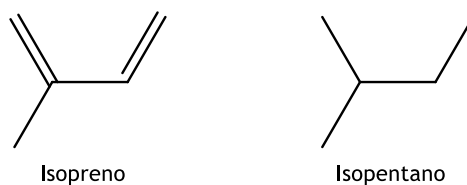


Figura 4 Estrutura do isopreno, considerada como a unidade estrutural dos terpenoides, e estrutura do isopentano.¹⁷

Nas plantas, as funções dos terpenos encontram-se associadas ao crescimento e ao metabolismo. Grande parte dos terpenos naturais apresentam estruturas cíclicas, com um ou mais grupos funcionais, sendo muito frequente a presença de terpenoides associados a glicósidos.^{16,17}

Os esqueletos carbonados dos terpenoides são construídos a partir da junção de unidades de cinco carbonos. Assim, os terpenoides são classificados de acordo com o número de unidades de cinco carbonos que os constituem, dividindo-se essencialmente em hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos (carotenoides).^{16,17}

Os hemiterpenos é a classe de terpenos mais simples, contendo apenas cinco átomos de carbono. Dentro desta classe encontram-se muitos compostos com o esqueleto de isopentano. Os monoterpenos apresentam dez carbonos, uma vez que são constituídos por duas unidades de isopreno. Os compostos desta classe são o principal componente de muitos óleos essenciais. A classe dos sesquiterpenos refere-se aos terpenos com três unidades de isopreno e podem apresentar uma estrutura alifática, bicíclica ou tricíclica. Quanto ao diterpenos, estes possuem quatro unidades de isoprenos e não são voláteis.¹⁷

Os triterpenos são compostos por seis unidades de isopreno e derivam biosinteticamente do esqualeno (Figura 5). Dentro desta classe estão incluídos diferentes grupos, como o triterpenos comuns, os esteroides, as saponinas e os heterósidos cardiotônicos. As saponinas e os heterósidos cardiotônicos são maioritariamente triterpenos ou esteroides que aparecem principalmente como glicósidos. Os esteroides encontrados nas plantas, os fitoesteróis, são praticamente todos hidroxilados no carbono da posição três e consideram-se esteróis. Os esteróis possuem um sistema de anéis ciclopentano-per-hidrofenantreno (Figura 5).^{16,17}

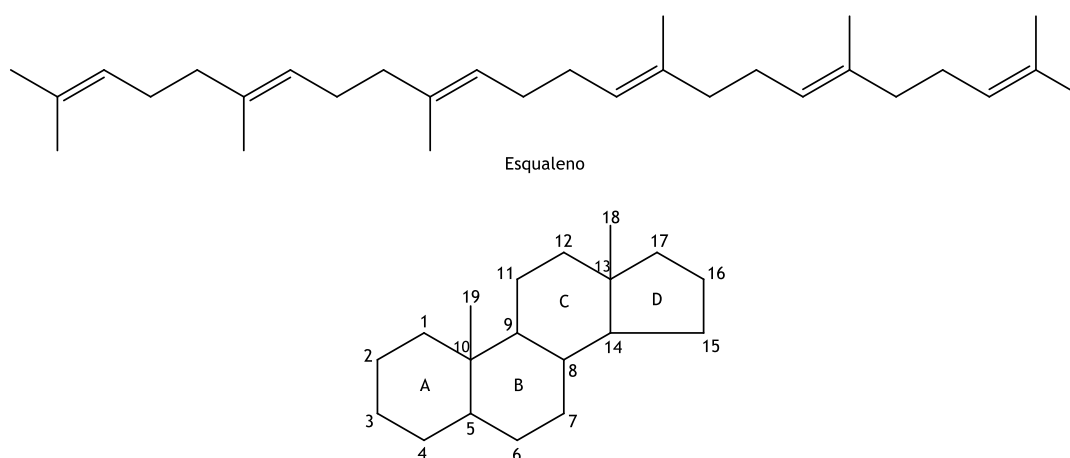


Figura 5 Estrutura do esqualeno e núcleo de um derivado do ciclopentano-per-hidrofenantreno, com designação dos anéis e respetiva numeração.^{1,17}

Os tetraterpenos possuem oito unidades isoprénicas, o que perfaz um total de 40 átomos de carbono e o grupo mais importante são os carotenoides. Os carotenoides são caracterizados por possuir, no mínimo, 10 ligações duplas conjugadas e as suas funções principais nas plantas prendem-se com a pigmentação na fotossíntese e com a coloração das flores e frutas. Atendendo a que os carotenoides, geralmente, são derivados do licopeno, a sua estrutura de ligações duplas conjugadas explica a sua coloração amarela ou alaranjada, podendo até ser vermelha em frutas (Figura 6). Os carotenoides podem ser acíclicos ou deterem ciclos com 5 ou

6 átomos carbonos numa ou em ambas as extremidades. Os que não são oxigenados são designados de carotenos, enquanto os oxigenados são denominados de xantofilas.^{1,16,17}

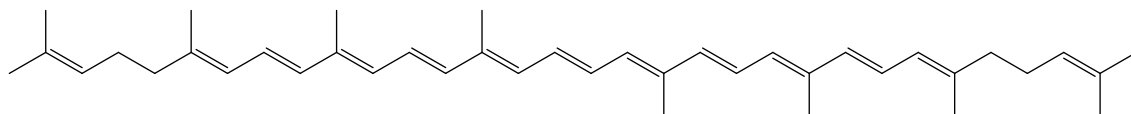


Figura 6 Estrutura do carotenoide licopeno, de onde derivam os restantes carotenoides.¹

1.3.4. Compostos fenólicos

O termo composto fenólico engloba uma ampla gama de metabolitos secundários presentes nas plantas e caracterizam-se por serem compostos não azotados e apresentarem um núcleo aromático com um ou mais anéis benzénicos, que contêm um ou mais substituintes hidroxilo. Estes compostos aparecem frequentemente combinados com glúcidos. Os compostos fenólicos derivam principalmente de duas vias, a via do ácido chiquímico e a via do acetato. Quanto às suas funções podem desempenhar um papel protetor e regulador.^{1,16}

Os compostos fenólicos englobam várias classes, como os ácidos fenólicos, fenóis livres e derivados, as cumarinas, os flavonoides, os taninos e os compostos quinónicos. Nesta revisão bibliográfica, apenas serão abordadas as classes de compostos fenólicos às quais pertencem os compostos posteriormente identificados na identificação fitoquímica.^{1,18}

1.3.4.1. Ácidos fenólicos e fenóis

Os ácidos fenólicos e os fenóis livres são normalmente considerados em conjunto, pois geralmente a sua identificação e determinação quantitativa ocorre simultaneamente. Estes compostos resultam, principalmente, da via do ácido chiquímico. Os fenóis livres são relativamente raros nas plantas, uma vez que frequentemente são encontrados sob a forma de heterósidos ou ésteres. Sob a forma de fenol livre, o amplamente difundido nas plantas é a hidroquinona. Os ácidos fenólicos mais abundantes no reino vegetal derivam, principalmente, do ácido benzoico e do ácido cinâmico (Figura 7). Os que são originados a partir do ácido benzoico encontram-se sobretudo hidroxilados e alguns ligados a oses. Quanto aos que derivam do ácido cinâmico, são maioritários os que se encontram sob a forma de heterósidos fenilpropanóicos (C₆-C₃).^{1,16}

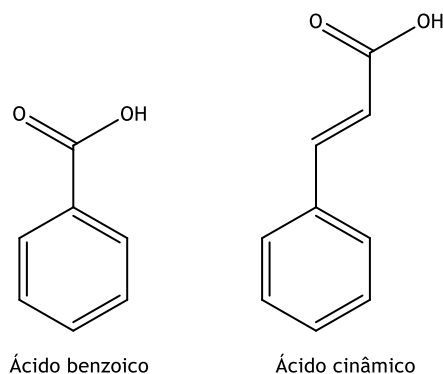


Figura 7 Estrutura do ácido benzoico e do ácido cinâmico, dos quais derivam a maioria dos ácidos fenólicos.¹

A determinação do conteúdo de compostos fenóis totais pode ser realizada por diversas técnicas. Contudo, a quantificação espectrofotométrica mais extensivamente utilizada é a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu. O reagente é constituído por uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, onde o molibdénio e o tungsténio estão no estado de oxidação +6 e apresentam cor amarela. Na presença de determinados agentes redutores, como os compostos fenólicos, forma-se o molibdénio azul e o tungsténio azul, onde o estado de oxidação está entre 5 e 6. A absorção máxima destes pigmentos azuis está dependente da composição qualitativa e/ou quantitativa das misturas fenólicas e a sua coloração permite a medição colorimétrica e a determinação da concentração das substâncias em estudo. O mecanismo do método de Folin-Ciocalteu tem por base a transferência de eletrões entre os compostos e o molibdénio, que é reduzido no complexo. Esta reação só ocorre em meio alcalino, o que demonstra a importância da adição do carbonato de sódio.¹⁸⁻²⁰

1.3.4.2. Flavonoides

Os flavonoides são um dos grupos de constituintes mais abundantes e difundidos no reino vegetal, desempenham inúmeras funções e formam um amplo grupo de metabolitos secundários, que podem apresentar atividades biológicas muito diferentes. Estes compostos procedem da combinação da via do ácido chiquímico e da via do acetato e todos apresentam com base estrutural a flavona.^{1,15,16}

O termo flavonoides inclui uma ampla gama de compostos que apresentam pequenas variações na sua estrutura básica. Podem ocorrer na forma aglicona, heterosídica ou como derivados metilados. A atividade farmacológica dos flavonoides varia dependendo da sua estrutura química. Quando se encontram na forma aglicona, os flavonoides são constituídos por um anel benzénico (A), condensado com um anel de seis membros (B), que se encontra substituído na posição 2 com um anel fenílico (C) (Figura 8). O anel B condensado com o anel benzénico pode ser uma γ -pirona (flavonois e flavonas) ou o seu derivado di-hidro (flavanonas). Na forma

glicosilada, se a ligação das oses à aglicona ocorrer por conjugação com os hidroxilos origina O-heterósidos, mas se ocorre diretamente no carbono formam-se C-heterósidos.¹

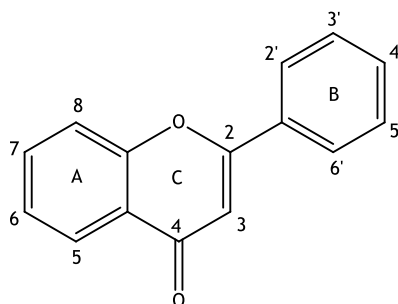


Figura 8 Estrutura básica da flavona e respectiva identificação dos anéis e numeração dos carbonos.^{1,19}

Os flavonoides são pigmentos das plantas e são subdivididos em duas classes principais, de acordo com a posição dos substituintes benzênicos, os flavonoides (substituição na posição 2) e os isoflavonoides (substituição na posição 3). Os flavonóis diferem das flavonas pela presença adicional de um grupo hidroxilo na posição 3. As flavanonas são derivados di-hidro uma vez que não possuem a ligação dupla entre C₂-C₃. As flavanonas são 2,3-di-hidroflavonas enquanto que os flavanonois são 2,3-di-hidroflavonois, também conhecido como dihidroflavonois. As catequinas diferem-se dos flavonoides, uma que não possuem o grupo carbonilo característico no anel C. As antocianinas são catiões flavílio, encontram-se estruturalmente relacionadas com os flavonóis e são glucósidos hidrossolúveis das antocianidinas.^{1,15} (Figura 9)

As antocianinas são compostos intensamente coloridos, sendo responsáveis pelas cores que vão desde os vermelhos aos azuis, nas pétalas das flores e nos frutos, enquanto que as flavanonas, as flavonas e os flavonóis apresentam cores menos intensas, variando do incolor ao amarelo.^{1,15}

O sistema aromático altamente conjugado que se encontra na base estrutural dos flavonoides leva a que estes exibam espectros de absorção característicos e intensos na região do ultravioleta (UV).

A determinação do teor de flavonoides, por espectrofotometria, pode ser realizada por diversas técnicas, mas a mais extensivamente utilizada é a que assenta no ensaio colorimétrico com o cloreto de alumínio, em meio alcalino. Nesta metodologia, ocorre a complexação do ião alumínio (Al³⁺) com os flavonoides presentes na amostra, formando um complexo estável flavonoide-Al³⁺, que apresenta coloração amarela com intensidade proporcional à concentração de flavonoides presentes na amostra. A complexação provoca um deslocamento batocrômico considerável e conseqüentemente uma intensificação das absorções. Este efeito permite a quantificação dos flavonoides sem a interferência de outros compostos fenólicos presentes, uma vez que estes absorvem comprimentos de onda inferiores, mesmo que formem complexos com o AlCl₃. Os flavonoides que não possuem um grupo hidroxilo livre, como substituinte na posição 3 ou 5, não conseguem formar complexos com a adição do cloreto de alumínio, não ocorrendo uma alteração dos seus espectros de absorção.²¹⁻²³

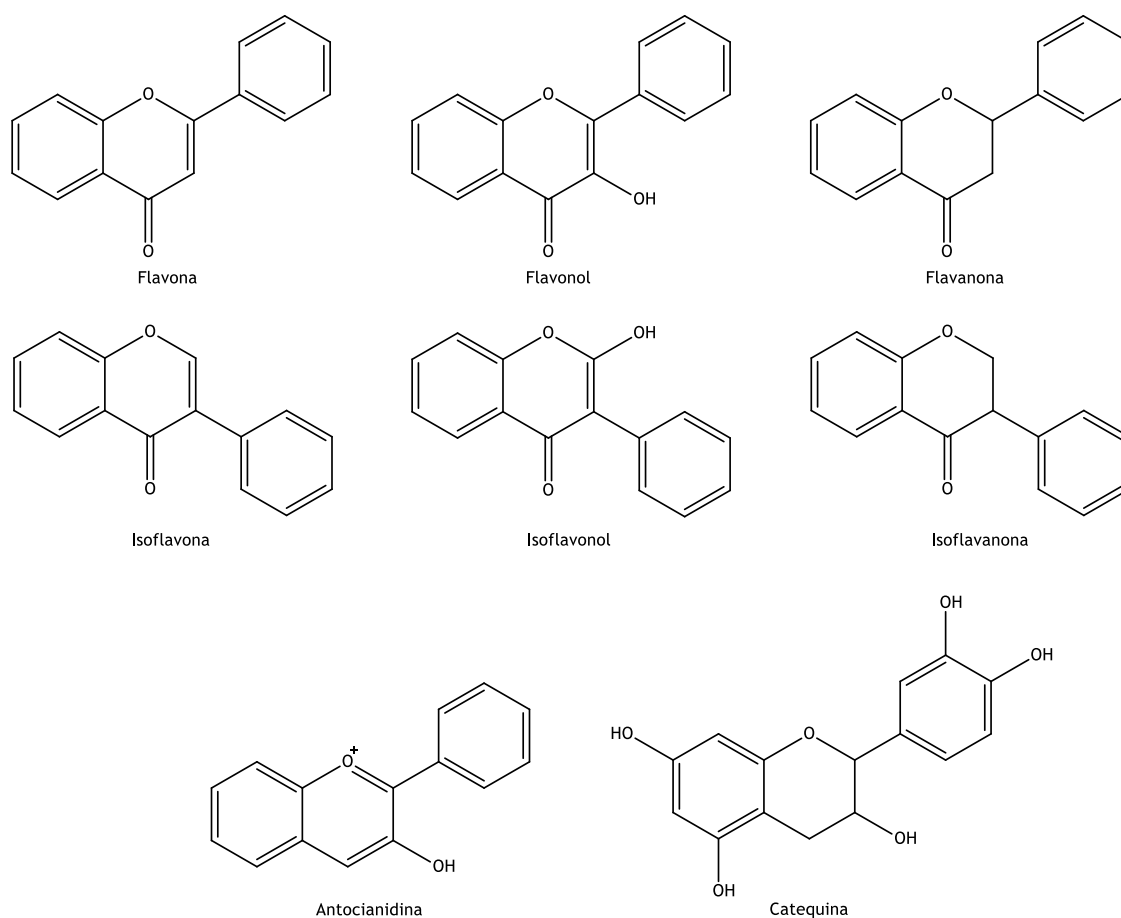


Figura 9 Estruturas básicas das diversas classes de flavonoides: flavona, flavonol, flavanona, isoflavona, isoflavonol, isoflavanona, antocianidina e catequina.^{1,19}

1.3.4.3. Cumarinas

As cumarinas são lactonas e derivam do 5,6-benzo-2-pirona, que é formado a partir do ácido *o*-hidroxicinâmico por ciclização entre o grupo fenol e o grupo carboxilo (Figura 10). As cumarinas simples resultam de substituições no anel benzênico e dentro desta classe podem ser distinguidas as cumarinas C-preniladas e as O-preniladas.^{1,15}

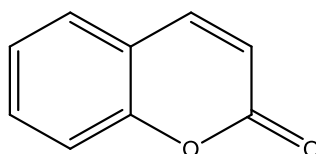


Figura 10 Estrutura química da cumarina (5,6-benzo-2-pirona), esqueleto básico desta classe.¹

A partir das cumarinas simples podem obter-se outros compostos cumáricos, como as furanocumarinas, as piranocumarinas, as cumarinas diméricas e as furanocromonas. As

furancumarinas contêm, como substituinte, um anel de furano, enquanto as piranocumarinas possuem um anel de pirano, porém ambas podem ser lineares ou angulares.^{1,15}

1.3.5. Grupos protetores

A inserção de um grupo protetor numa molécula introduz uma modificação num ou mais grupos funcionais desta. Nos estudos de plantas, a utilização de grupos protetores prende-se sobretudo com a quantidade de ácidos carboxílicos e grupos hidroxilo livres destas, o que dificulta o seu fracionamento e identificação. Assim, utilizam-se principalmente duas estratégias, a acetilação e a metilação com diazometano.

O diazometano é um agente de metilação que pode ser aplicado em vários grupos funcionais, como os ácidos carboxílicos, os álcoois, os fenóis e as amidas. Normalmente, encontra-se em solução éterea. A utilização de diazometano para metilação dos ácidos carboxílicos livres é muito seletiva e geralmente resulta na formação de ésteres metílicos. O procedimento mais frequente é adicionar porções da solução de diazometano em éter dietílico à amostra em estudo e reação é considerada completa quando cessa a libertação de gás (azoto).²⁴

A acetilação é uma estratégia bastante comum e pode ser utilizada com diferentes condições reacionais, mas a mais frequente é a utilização do anidrido acético. A acetilação com anidrido acético é sobretudo aplicada em álcoois, aminas e tióis. Os grupos hidroxilo livres dos álcoois podem ser protegidos com grupos acetato. Por exemplo, neste caso, dois métodos de acetilação que podem ser utilizados são a combinação de anidrido acético com 4-dimetilaminopiridina (DMAP) e trietilamina e a utilização de acetato de sódio com anidrido acético. O primeiro método é bastante eficaz uma vez que a utilização de DMAP aumenta a taxa de acetilação, pois este funciona como catalisador da reação.²⁴

1.3.6. Avaliação biológica

Os ensaios de atividade biológica permitem determinar a atividade de compostos individuais ou grupo de compostos, como os extratos de plantas. Esta determinação leva à identificação do potencial da amostra em estudo. Existe uma ampla gama de atividades biológicas que podem ser avaliadas, que se encontram associadas a diversas patologias. Um exemplo de uma atividade biológica habitualmente determinada em estudos com extratos de plantas é a atividade antioxidante.

Recentemente tem crescido o interesse na investigação sobre o papel dos antioxidantes derivados de plantas, na alimentação e na saúde humana. Um antioxidante é geralmente definido como uma substância que inibe ou retarda a oxidação de um substrato, quando

presente em concentrações inferiores à do substrato, protegendo-o contra a ação dos radicais livres.^{1,19,25}

Os radicais livres são átomos ou moléculas extremamente reativas e instáveis que possuem um elétron desemparelhado. A sua instabilidade e reatividade leva-os a tentar emparelhar esse elétron de uma forma rápida e eficaz, ao reagirem com outras moléculas, desencadeando uma reação radicalar em cadeia, formando continuamente novos radicais livres. A reação termina com a presença de um antioxidante. Estes radicais são produzidos continuamente.^{1,26}

A transferência de eletrões que ocorre nos processos químicos fundamentais, como a respiração celular, leva à produção de radicais livres e outras espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS). A formação de radicais livres pode ser díspar, pode ocorrer de forma enzimática ou não. Estes radicais estão implicados em diversas funções no organismo, podendo estar associados à produção de energia, síntese de substâncias biológicas importantes, sinalização intercelular, entre outras. O excesso destas espécies reativas desencadeia uma série de efeitos nocivos, que podem abranger desde danos no ADN e nos organelos, à oxidação de lípidos e proteínas e até alterações na estrutura e funções das células, o que desencadeia uma série de patologias. As alterações do ADN por danos oxidativos são prejudiciais, uma vez que têm um impacto negativo significativo na transcrição e replicação de genes, sendo uma das causas responsáveis pelo desencadeio do processo carcinogénico. A oxidação dos lípidos é potencialmente adversa para as membranas celulares e constitui um processo em cadeia, uma vez que a formação de um radical lipídico desencadeia a propagação do processo peroxidativo.^{1,20,26,27}

Quando os sistemas de defesa antioxidante do organismo não conseguem combater os níveis elevados de radicais livres ocorre um desequilíbrio entre ROS/radicais livres e os sistemas antioxidante/reparação, desencadeando *stress* oxidativo. O *stress* oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a formação de radicais (agentes oxidantes) e a capacidade do organismo para neutralizar a sua ação pelos sistemas proteção antioxidantes. O organismo apresenta vários sistemas de defesa antioxidante que compreendem vários compostos, sendo alguns deles de natureza enzimática. Entre os diversos compostos que constituem o sistema antioxidante podemos encontrar os flavonoides, a vitamina E, a vitamina C, o β -caroteno, a albumina, a superóxido dismutase, a catalase, a glutatíon peroxidase, entre outros. O objetivo dos sistemas oxidantes é combater os danos provocados pelas ROS/RNS.^{1,20,25-27}

O *stress* oxidativo encontra-se associado a diversas patologias, como o cancro, as doenças cardiovasculares, as doenças neurodegenerativas, a diabetes e doenças inflamatórias. O combate ao *stress* oxidativo pode ser realizado não só pelos sistemas de defesa internos como por substâncias externas ingeridas na dieta, como por exemplo, alguns alimentos ou bebidas. A ingestão de antioxidantes exógenos pode melhorar o dano causado pelo *stress* oxidativo, pela inibição da iniciação ou da propagação da reação oxidativa em cadeia, atuando como eliminadores dos radicais livres.^{20,25-27}

Os antioxidantes podem atuar de diferentes formas, como sequestrando os radicais livres, decompondo os peróxidos e quelando íons metálicos. Consequentemente, a atividade antioxidante deve ser avaliada por diferentes métodos que abranjam diferentes mecanismos químicos de atividade antioxidante, uma vez esta varia com o método empregue na sua determinação.^{25,28}

De acordo com a reação química envolvida, as metodologias para determinação da atividade antioxidante podem ser agrupadas em duas classes: transferência de átomos de hidrogénio e transferência de eletrões. Os métodos que se baseiam na transferência de átomos de hidrogénio medem a capacidade de um antioxidante para inibir os radicais livres por doação de átomos de hidrogénio. Os métodos que assentam na transferência de eletrões medem a capacidade de um antioxidante pra transferir um eletrão para os radicais livres reduzidos, metais ou carbonilos.²⁸

A variação da atividade antioxidante com a metodologia empregue na sua determinação é um dos inconvenientes, uma vez que dependendo do método, com a mesma amostra pode obter-se resultados diferentes. A complexidade do mecanismo antioxidante nas matrizes biológicas e o facto de um conjunto de fatores poder desempenhar diferentes papéis, leva a que apenas um método de determinação seja insuficiente para se chegar a uma conclusão. Portanto, aplicam-se diferentes métodos, determinando-se propriedades distintas.²⁸

1.3.6.1. Atividade antioxidante - Método do DPPH

A determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH é a metodologia que se utiliza mais extensivamente.²⁹

O radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) é relativamente estável e sensível à luz, possui um eletrão desemparelhado deslocalizado, que lhe confere uma cor violeta, absorvendo a um comprimento de onda específico (517 nm). Quando colocado na presença de um antioxidante ocorre redução do DPPH. O átomo de azoto do DPPH recebe um átomo de hidrogénio da espécie antioxidante, formando difenil-picrilhidrazina que apresenta carateristicamente uma coloração amarela (Figura 11). Paralelamente ocorre a redução de cor, o que leva ao desaparecimento da absorvância, observando-se um aumento gradual ou abrupto do decréscimo desta em função do poder do antioxidante.^{1,29}

A atividade sequestradora do radical DPPH é a base de todo o método. Esta atividade é expressa através da percentagem de inibição (% I), que não é mais do que a percentagem de radicais DPPH que foram eliminados, ou seja, que foram sequestrados. Os resultados obtidos permitem também o cálculo da concentração inibitória (IC₅₀), que é definida como a concentração de antioxidante necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial de DPPH. Quanto maior o consumo de DPPH por um antioxidante menor será o seu IC₅₀ e consequentemente maior será a sua atividade antioxidante.^{29,30}

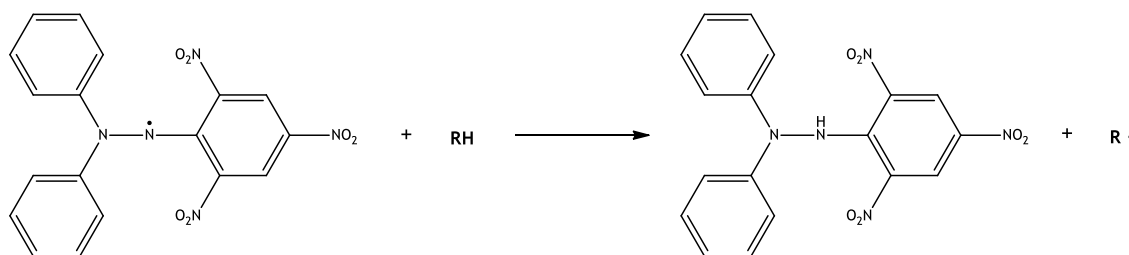


Figura 11 Reação entre o radical livre DPPH e o composto antioxidante (RH), o que resulta na formação da difenil-picrilhidrazina.³⁰

Existem diversas formas de expressar os resultados da atividade antioxidante obtidos no método de DPPH. A mais usada atualmente é o Índice de Atividade Antioxidante (AAI), que a classifica em pobre, moderada, forte ou muito forte.²⁹

1.3.6.2. Atividade antioxidante - Sistema β -caroteno/ácido linoleico

A determinação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico avalia a capacidade de uma substância para neutralizar os radicais livres que se geram com a oxidação do ácido linoleico, o que evita a degradação do β -caroteno. A oxidação do ácido linoleico forma o radical peróxido do ácido linoleico (LOO^\bullet), que subsequentemente ataca as moléculas de β -caroteno altamente insaturadas presentes na emulsão. A oxidação do ácido linoleico ocorre devido à sua exposição ao oxigénio, uma vez que este é sensível ao oxigénio, o que resulta na formação dos radicais hidroperóxido, por abstração de um átomo de hidrogénio de um dos seus grupos de metileno-dialílicos. O ataque às moléculas de β -caroteno leva à sua oxidação, resultando na perda do seu cromóforo, o que consequentemente provoca um desvanecimento da cor laranja do β -caroteno, o qual pode ser monitorizado por espectrofotometria. O processo pode ser interrompido por doação de átomos de hidrogénio por parte das substâncias antioxidantes. Assim, a descoloração do β -caroteno depende da capacidade antioxidante das amostras em estudo.^{19,31-33}

A extensão da proteção dos sistemas lipídicos, por parte das amostras em estudo, deve ser comparada com padrões puros, como o butil-hidroxitolueno (BHT) e o α -tocoferol, na mesma concentração molar. A utilização de um padrão não se prende apenas com o aspeto comparativo mas também para garantir a reprodutibilidade do teste.³⁴

2. Parte experimental

2.1. Métodos gerais

Os reagentes e solventes utilizados foram adquiridos à Fisher, Merck, Aldrich ou Acros Organics e eram analiticamente puros e, sempre que necessário, foram secos e purificados por métodos padronizados.³⁵

As leituras das absorvâncias para caracterização química quantitativa foram realizadas num espectrofotômetro Thermo Fisher Scientific™ evolution 160 UV-Vis.

O processo de fracionamento dos extratos foi realizado por cromatografia em coluna (CC), utilizando como fase estacionária sílica gel 60 Å (70-200 µm). A fase móvel utilizada é descrita em cada caso. Sempre que possível as colunas foram realizadas a pressão moderada utilizando uma bomba apropriada. Nos casos em que não foi possível, foram feitas à pressão ambiente. As frações orgânicas obtidas, em cada coluna cromatográfica, foram concentradas em evaporadores rotativos do tipo Büchi Rotavapor R-114.

As cromatografias em camada fina (CCF) foram realizadas em placas de alumínio de 0,2 mm revestidas com sílica-gel da Macherey-Nagel (60 G/UV₂₅₄). Os eluentes e a respetiva proporção volumétrica, no caso dos eluentes mistos, são referidos em cada caso. Após eluição, as placas foram visualizadas com luz UV ($\lambda = 254$ nm) e de seguida foram imersas numa solução reveladora. A escolha da solução reveladora foi influenciada pela melhor visualização dos compostos presentes, sendo utilizadas duas: A) solução reveladora de vanilina, constituída por 3,0 g de vanilina, 100 mL de etanol e 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e B) solução reveladora de ácido fosfomolibdico, na qual se adicionam 100 ml de etanol a 5,0 g de ácido fosfomolibdico. Depois de imersas, os cromatogramas foram aquecidos a 250°C, durante alguns segundos, com o objetivo de revelar os produtos.

Nas reações de acetilação, como o substrato é um extrato vegetal não é conhecido o valor da sua massa molar. Assim, os reagentes foram colocados em excesso ocorrendo apenas proporção entre estes e não com o substrato.

Os espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos por refletância total atenuada (ATR) num espectrofotômetro Thermo Fisher Scientific Nicolet iS10: smart iTR e *software* Omnic 8.2, com um *background* com 64 *scans* e as amostras com 32 *scans* e resolução de 4 cm⁻¹, entre 4000 cm⁻¹ e 600 cm⁻¹.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de protão (¹H) e carbono (¹³C) foram efetuados num espectrómetro Brüker Avance III, onde os espectros de RMN de ¹H foram adquiridos a 400,13 MHz e os espectros de RMN de ¹³C a 100,62 MHz. O processamento foi realizado no

software Topspin 3.1. e os solventes utilizados foram o clorofórmio deuterado (CDCl_3) ou o dimetilsulfóxido hexadeuterado ($\text{DMSO}-d_6$), sendo também utilizados como padrão interno (CDCl_3 : $\delta = 7,26$ ppm e $77,16$ ppm ou $\text{DMSO}-d_6$: $\delta = 2,50$ ppm e $39,52$ ppm, para RMN de ^1H e ^{13}C , respetivamente). Quando necessário também foi realizada a técnica de intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização (DEPT) e os espectros de correlação heteronuclear a uma ligação (HSQC) e de correlação heteronuclear a múltiplas ligações (HMBC). Os desvios químicos (δ) estão expressos em ppm.

Todas as estruturas químicas apresentadas foram desenhadas no *software* ChemDraw Ultra 12.0.2 da CambridgeSoft.

Nas análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), a cromatografia gasosa foi efetuada num cromatógrafo Agilent® Technologies 7890A GC-system equipado com uma coluna capilar DB5-MS com 30 m de comprimento, 0,25 diâmetro interno e um filme de polimetilsiloxano (módulo de coluna LTM J&W) de espessura 0,25 μm . Inicialmente, a coluna foi programada para atingir uma temperatura de 60°C , mantendo-a durante alguns minutos. De seguida, a temperatura aumentou até aos 200°C , numa rampa de crescimento de 4°C por minuto, permanecendo a esta temperatura durante alguns minutos. Posteriormente, iniciou uma nova rampa aumentando a temperatura de 200°C para 280°C , numa rampa de crescimento de 10°C por minuto. A temperatura final manteve-se constante durante algum tempo. A temperatura do injetor foi de 250°C e a do detetor foi de 180°C . O gás suporte utilizado foi hélio com um caudal de 1 mL por minuto com volume de injeção de amostra de 1 μL . Quanto à espectroscopia de massa foi realizada num Agilent® Technologies 5975C, Inert XL MSD com detetor triple-Axis, que se encontra acoplado ao cromatógrafo descrito acima. As condições de operação foram as acima referidas com uma voltagem de ionização de 70 eV e com uma temperatura de 230°C na fonte iónica. A análise dos espectros foi efetuada no *software* Chemstation para análise das áreas obtidas e dos vários constituintes. Esta análise foi ainda auxiliada pelo *software* NIST mass spectral. O solvente utilizado na dissolução dos produtos para análise por GC-MS foi diclorometano seco.

2.2. Extratos

Os extratos utilizados são resultado de um trabalho anterior desenvolvido por Nelson Martins, onde o objetivo era a otimização da extração dos compostos ativos presentes nas cascas de *Salix salviifolia* subsp. *salviifolia*.³⁶

As amostras foram obtidas a partir de troncos e ramos colhidos na freguesia de Três Povos, perto da localidade de Escarigo, Fundão (Coordenadas: $40^\circ 14' 14.78''\text{N}$ / $7^\circ 16' 42.03''\text{W}$). Após a recolha, as cascas foram retiradas e colocadas a secar a 30°C durante 15 dias, sendo

posteriormente moídas. As amostras foram colhidas a 22 de janeiro de 2014 e colocadas a secar a 24 de janeiro de 2014.³⁶

A extração dos compostos ativos foi realizada em duas fases. Primeiramente, recolheram-se os compostos mais apolares, por extração com *n*-hexano, em soxhlet a quente. O extrato obtido foi ao evaporador rotativo de forma a retirar-se o solvente. Após esta extração, as cascas foram submetidas a outro processo extrativo com o objetivo de recolher os compostos polares. Assim, fez-se uma extração sob refluxo a quente com etanol/água (80/20), na qual a razão entre a amostra e o solvente foi 1:20. Após a extração, fez-se uma filtração a vácuo e por fim evaporaram-se os filtrados obtidos.³⁶

2.3. Extrato etanol/água (80/20)

2.3.1. Determinação dos fenóis totais

A determinação de fenóis totais foi efetuada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Para tal efetuou-se uma curva de calibração com diferentes concentrações de soluções metanólicas de ácido gálico. O ácido gálico foi utilizado como padrão fenólico nas seguintes concentrações: 50, 100, 125, 150, 200, 225, 250, 300, 325, 350, 400 e 500 mg/L.³⁷⁻³⁹

Para este ensaio, adicionaram-se 450 µL de água destilada a 50 µL das soluções referidas anteriormente e de seguida adicionou-se 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2N. Este último foi preparado a partir de uma solução comercial de 2N, a qual foi diluída com água destilada de forma a obter a concentração pretendida. Após a adição do ácido gálico, da água destilada e do reagente de Folin-Ciocalteu deixou-se reagir 5 minutos à temperatura ambiente para de seguida adicionar 2 mL de carbonato de sódio (solução aquosa de 75 g/L). Num banho de água a 30 °C, deixou-se a incubar durante 90 minutos, com agitação intermitente. O branco foi preparado segundo o descrito anteriormente, substituindo-se os 50 µL de solução por 50 µL de metanol. O ensaio foi realizado em triplicado e após a incubação leram-se as absorvâncias a 765 nm.³⁷⁻³⁹

A curva de calibração foi construída com as concentrações de ácido gálico no eixo das abcissas enquanto que as absorvâncias lidas foram colocadas no eixo das ordenadas (Figura 12).

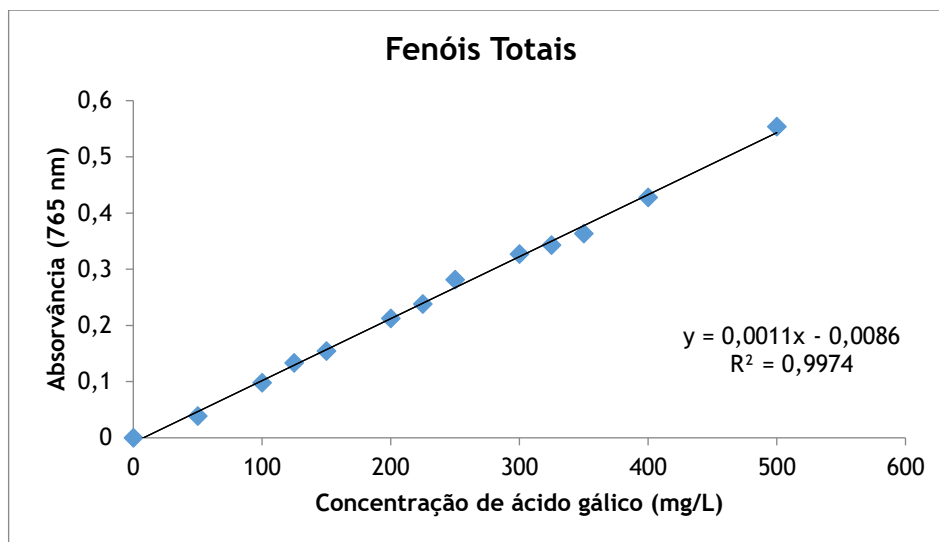


Figura 12 Curva de calibração do ácido gálico para determinação dos fenóis totais, obtida a partir da média das leituras das absorvâncias em triplicado.

Para determinação do teor de fenóis totais no extrato, substituiu-se os 50 µL iniciais por 50 µL de uma solução do extrato em metanol e procedeu-se como descrito anteriormente.³⁷⁻³⁹

Para calcular a quantidade de fenóis totais presente no extrato utilizou-se a equação da curva de calibração do ácido gálico em metanol. O resultado é expresso em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de matéria seca (mg EAG/g matéria seca).³⁷⁻³⁹

2.3.2. Determinação dos flavonoides totais

A determinação dos flavonoides totais foi efetuada pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio. Para tal preparou-se uma curva de calibração com diferentes concentrações de soluções metanólicas de quercetina. A quercetina foi utilizada como composto de referência nas seguintes concentrações: 12,5; 30; 50; 70; 100; 230; 150 e 200 µg/mL.^{37,40}

A 500 µL das soluções anteriores adicionou-se 1,5 mL de metanol, 0,1 mL de solução aquosa de cloreto de alumínio (10%), 0,1 mL de solução aquosa de acetato de potássio 1M e por fim 2,8 mL de água destilada. À temperatura ambiente, deixou-se reagir durante 30 minutos, com agitação intermitente. O branco foi preparado segundo o descrito anteriormente, substituindo-se os 500 µL de solução por 500 µL de metanol. O ensaio foi realizado em triplicado e após a incubação leram-se as absorvâncias a 415 nm.^{37,40}

A curva de calibração foi construída com as concentrações de quercetina no eixo das abcissas enquanto que as absorvâncias lidas foram colocadas no eixo das ordenadas (Figura 13).

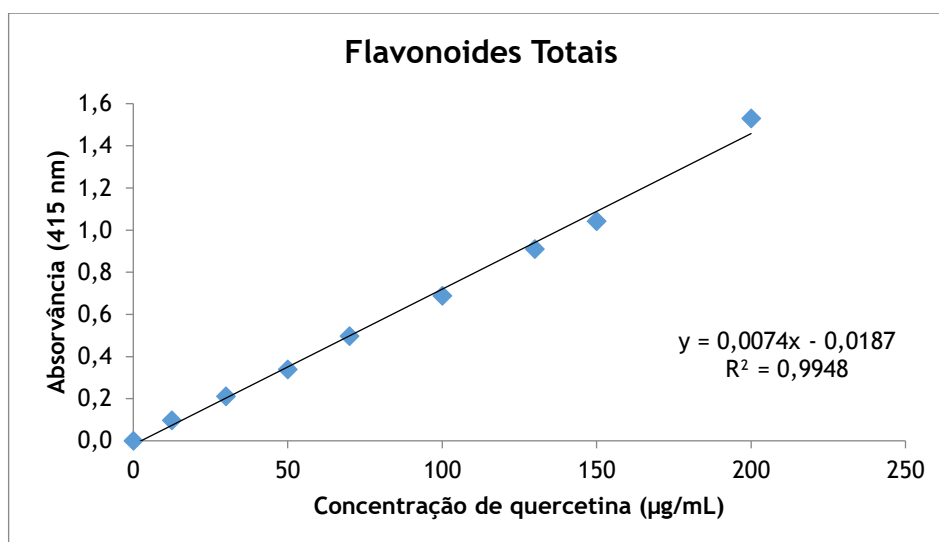


Figura 13 Curva de calibração da quercetina para determinação dos flavonoides totais, obtida a partir da média das leituras das absorvâncias em triplicado.

Para determinação do teor de flavonoides totais no extrato, substituiu-se os 500 µL iniciais por 500 µL de uma solução do extrato em metanol e procedeu-se como descrito anteriormente. Para o extrato, o ensaio foi realizado em quintuplicado.^{37,40}

Para calcular a quantidade de flavonoides totais presente no extrato utilizou-se a equação da curva de calibração da quercetina em metanol. O resultado é expresso em miligramas de equivalentes de quercetina por grama de matéria seca (mg EQ/g matéria seca).^{37,40}

2.3.3. Fracionamento do extrato bruto

O extrato obtido por refluxo etanol/água (80/20) foi fracionado por CC à pressão ambiente. A coluna foi cheia a seco e compactada a vácuo. Num balão de fundo redondo, colocou-se aproximadamente 1g de extrato, adicionou-se metanol e areia e levou-se o balão ao evaporador rotativo. Após a evaporação do solvente colocou-se a mistura no cimo da coluna. Como fase móvel utilizaram-se eluentes de polaridade crescente: clorofórmio, clorofórmio/acetato de etilo (90/10), clorofórmio/metanol (95/5), clorofórmio/metanol (50/10) e metanol. Com o aumento da quantidade de metanol, a sílica foi-se dissolvendo, levando a que as frações recolhidas contenham vestígios de sílica. As frações recolhidas foram analisadas por CCF com os eluentes clorofórmio/metanol (95/5) para as frações iniciais e clorofórmio/metanol (80/20) para as restantes, utilizando como controlo o extrato bruto. As placas de CCF foram reveladas utilizando a solução reveladora A. As frações recolhidas foram combinadas em 5 principais (frações de I a V), de acordo com as observações feitas após o UV e a revelação.

Este processo cromatográfico foi repetido até à obtenção de uma massa considerável de cada fração de forma a conseguir-se avançar para o subfracionamento.

A fração V (343 mg) obtida anteriormente foi fracionada por CC à pressão ambiente. Na preparação da coluna e da fração para CC procedeu-se como descrito para o extrato bruto. Como fase móvel utilizaram-se eluentes de polaridade crescente: clorofórmio/metanol (80/20), clorofórmio/metanol (70/30), metanol e água. As frações recolhidas foram analisadas por CCF com os eluentes clorofórmio/metanol (80/20) para as frações iniciais e clorofórmio/metanol (70/30) para as restantes, utilizando como controlo a fração V. As placas de CCF foram reveladas utilizando a solução reveladora A. As frações recolhidas foram combinadas, de acordo com as observações feitas após o UV e a revelação.

A fração IV (10,936 g) obtida a partir do extrato bruto foi fracionada por CC à pressão ambiente. O fracionamento desta fração foi realizado em diversas colunas cromatográficas devido à massa total da fração. Na preparação da coluna e da fração para CC procedeu-se como descrito para o extrato bruto. Como fase móvel utilizaram-se eluentes de polaridade crescente: clorofórmio/metanol (80/20), clorofórmio/metanol (60/40), metanol e água. As frações recolhidas foram analisadas por CCF com os eluentes clorofórmio/metanol (80/20) para as frações iniciais, clorofórmio/metanol (60/40) para as seguintes e metanol para as frações finais, utilizando como controlo a fração IV. As placas de CCF foram reveladas utilizando a solução reveladora A. As frações recolhidas foram combinadas, de acordo com as observações feitas após o UV e a revelação.

As frações combinadas a partir do fracionamento da fração IV e V e as frações I, II e III foram analisadas por CCF com os eluentes utilizados anteriormente e com a mesma solução reveladora. A observação destas placas levou à conclusão de que algumas destas frações continham os mesmos compostos pelo que foram recombinadas.

2.3.4. Metilação do extrato bruto

A 1,060 g de extrato bruto foi adicionada uma solução de diazometano em éter etílico, em excesso. Durante 48 h foi-se adicionando mais solução de diazometano ao extrato até cessar a libertação de azoto. Esta reação foi realizada à temperatura ambiente. A evaporação do solvente ocorreu à pressão atmosférica, dentro da *hotte*.

O produto resultante foi analisado por IV, por RMN em DMSO- d_6 e por GC-MS.

2.3.5. Acetilação do extrato bruto sem catalisador

A uma mistura de acetato de sódio anidro (3,166 g; 38,60 mmol) e anidrido acético (3,6 mL; 38,08 mmol) adicionou-se, lentamente e sob agitação, 0,503 g de extrato bruto. A mistura

reacional foi aquecida em refluxo durante 120 minutos. Como o início do aquecimento a mistura solidificou e foi necessário adicionar 3 mL de anidrido acético. Ao fim dos 120 minutos de reação efetuou-se uma CCF com os eluentes *n*-hexano/acetato de etilo (1/1). Para se ter a certeza que a reação ocorreu na totalidade deixou-se em refluxo mais 30 minutos, ao fim dos quais se efetuou uma nova CCF. Para revelar as placas de CCF utilizou-se a solução reveladora A. Após arrefecimento da mistura, o produto foi extraído com clorofórmio e a fase orgânica foi recolhida e seca com sulfato de sódio anidro, efetuando-se seguidamente uma filtração a vácuo. O excesso de solvente foi removido por evaporação.⁴¹

O produto obtido foi fracionado por CC a pressão moderada. A coluna foi cheia a seco e compactada a vácuo. Num balão de fundo redondo, colocou-se o produto obtido (1,030 g), adicionou-se diclorometano e sílica e levou-se o balão ao evaporador rotativo. Após a evaporação colocou-se a mistura no cimo da coluna. Como fase móvel utilizaram-se os eluentes *n*-hexano/acetato de etilo (80/20), *n*-hexano/acetato de etilo (50/50) e acetato de etilo. As frações recolhidas foram analisadas por CCF com os eluentes *n*-hexano/acetato de etilo (60/20), *n*-hexano/acetato de etilo (60/30), *n*-hexano/acetato de etilo (50/50) e acetato de etilo, utilizando como controlo o extrato acetilado anteriormente. As placas de CCF foram reveladas utilizando a solução reveladora A. As frações recolhidas foram combinadas, de acordo com as observações feitas após o UV e a revelação.

A sílica utilizada na coluna foi recolhida para um erlenmeyer, adicionou-se acetato de etilo e permaneceu em agitação durante 80 minutos, ao fim dos quais foi filtrada. Por fim adicionou-se água à sílica, permanecendo em agitação por 120 minutos. Ambas as frações foram recolhidas e evaporadas.

2.3.6. Acetilação do extrato bruto com catalisador

A 100 mg de extrato bruto adicionou-se trietilamina (8 mL; 57,71 mmol), DMAP e anidrido acético (5 mL; 52,89 mmol). A mistura reacional foi colocada em agitação à temperatura ambiente durante 24 horas, ao fim das quais se efetuou uma CCF com os eluentes *n*-hexano/acetato de etilo (70/30). A placa foi revelada na solução reveladora A. No final da reação, o produto foi lavado com NaHCO₃ 10%, HCl 2M e água destilada e extraído com diclorometano. A fase orgânica foi recolhida e seca com sulfato de sódio anidro, efetuando-se seguidamente uma filtração a vácuo. O excesso de solvente foi removido por evaporação. Após evaporação do diclorometano, o produto foi co-evaporado com *n*-hexano e tolueno de forma a retirar o anidrido acético. Este processo foi denominado Acetilação I.

O processo de acetilação foi repetido utilizando como ponto de partida 305 mg de extrato bruto. A quantidade dos reagentes aumento na mesma proporção e manteve-se o restante procedimento experimental. Este processo foi denominado Acetilação II.

Os dois produtos da acetilação foram analisados separadamente por GC-MS e o produto da Acetilação I foi analisado por IV.

O produto obtido na Acetilação II foi fracionado por CC a pressão moderada. A coluna foi cheia a seco e compactada a vácuo. Num balão de fundo redondo, colocou-se o produto obtido (1,553 g), adicionou-se diclorometano e sílica e levou-se o balão ao evaporador rotativo. Após a evaporação colocou-se a mistura no cimo da coluna. Como fase móvel utilizaram-se os eluentes *n*-hexano, *n*-hexano/acetato de etilo nas proporções, respetivamente, 95/5, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50, respetivamente, e seguidamente acetato de etilo, acetato de etilo/metanol (95/5) e metanol. As frações recolhidas foram analisadas por CCF com os eluentes *n*-hexano/acetato de etilo nas proporções, respetivamente, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50, acetato de etilo, acetato de etilo/metanol (98/2) e acetato de etilo/metanol (50/50). As placas de CCF foram reveladas utilizando a solução reveladora A. As frações recolhidas foram combinadas, de acordo com as observações feitas após o UV e a revelação.

Para o fracionamento do produto obtido na Acetilação I (214 mg) utilizou-se o mesmo procedimento experimental do fracionamento da Acetilação II.

As frações combinadas a partir do fracionamento da Acetilação I e Acetilação II foram analisadas por CCF com os eluentes utilizados anteriormente e com a mesma solução reveladora. A observação destas placas levou à conclusão de que algumas destas frações conteriam os mesmos compostos pelo que foram recombinadas.

Algumas frações resultantes foram analisadas por RMN em GC-MS.

2.4. Extrato *n*-hexano

2.4.1. Processo de separação

A 4,885 g de extrato bruto adicionou-se metanol e colocou-se num banho a 50°C, com agitação. A mistura permaneceu no banho até apresentar um aspeto de suspensão homogénea. Retirou-se a mistura do banho, adicionou-se metanol e deixou-se repousar. Com a adição do metanol à mistura quente formaram-se 3 fases: uma fase superior, que se encontrava límpida, uma fase intermédia, que apresentava pequenas partículas, e uma fase inferior, constituída por um sólido.

As três fases foram separadas por decantação. Posteriormente, efetuou-se uma filtração, através de um funil de Buchner com dois papéis de filtro. A fase inferior permaneceu no balão e foi lavada com metanol. A fase superior foi deixada em repouso, no kitasato, durante algum tempo, ao fim do qual foi decantada para um balão e evaporada. A fase intermédia foi colocada

num balão de fundo redondo, os papéis de filtro foram lavados com diclorometano para dentro do balão anterior, tendo-se concentrado fase no evaporador rotativo.

2.4.2. Fracionamento da fase superior

A fase superior obtida no processo anterior foi fracionada por CC a pressão moderada. A coluna foi cheia a seco e compactada a vácuo. Num balão de fundo redondo, colocou-se o produto obtido (1,250 g), adicionou-se diclorometano e sílica e levou-se o balão ao evaporador rotativo. Após a evaporação colocou-se a mistura no cimo da coluna. Como fase móvel utilizaram-se os eluentes *n*-hexano, *n*-hexano/acetato de etilo nas proporções, respetivamente, 98/2, 95/5, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50, respetivamente, e seguidamente acetato de etilo. As frações recolhidas foram analisadas por CCF com os eluentes *n*-hexano/acetato de etilo nas proporções, respetivamente, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50 e acetato de etilo. As placas de CCF foram reveladas utilizando a solução reveladora B. As frações recolhidas foram combinadas, de acordo com as observações feitas após o UV e a revelação.

A sílica utilizada na coluna foi recolhida para um erlenmeyer, adicionou-se metanol e permaneceu em agitação durante aproximadamente 3 horas, ao fim dos quais foi filtrada e lavada com metanol. A fração foi recolhida e o solvente evaporado.

Algumas frações obtidas foram analisadas diretamente por RMN em CDCl_3 e por GC-MS. Enquanto outras frações, para poderem ser analisadas por GC-MS, tiveram de ser metiladas com diazometano, através da sua adição, numa solução em éter etílico, até cessar a libertação de azoto.

2.4.3. Saponificação

Para este processo a fase intermédia e a fase inferior obtidas anteriormente foram denominadas de B1 e B2, respetivamente. No processo de separação de 2.4.1. obteve-se 871 mg de B1 e 2,764 g de B2. Para efeitos de cálculo de adição dos reagentes, considerou-se que B1 era 1 g e que B2 eram 3 g.

Para ocorrer a saponificação, dissolveu-se B1 em 60 mL de uma solução de hidróxido de sódio/metanol 5% e colocou-se em agitação, à temperatura ambiente, durante aproximadamente 16 horas. Retirou-se a agitação e evaporou-se o metanol. Adicionou-se água ao balão com B1 e extraiu-se com diclorometano ($\times 3/4$). Durante a extração formou uma emulsão e adicionou-se solução saturada de cloreto de sódio, a qual não desfez a emulsão, o que levou a deixar-se em repouso para o dia seguinte, numa tentativa de melhorar a separação das fases. Como não existiu grande alteração na separação das fases, prosseguiu-se com a extração com diclorometano. A fase orgânica foi recolhida, seca com sulfato de sódio anidro,

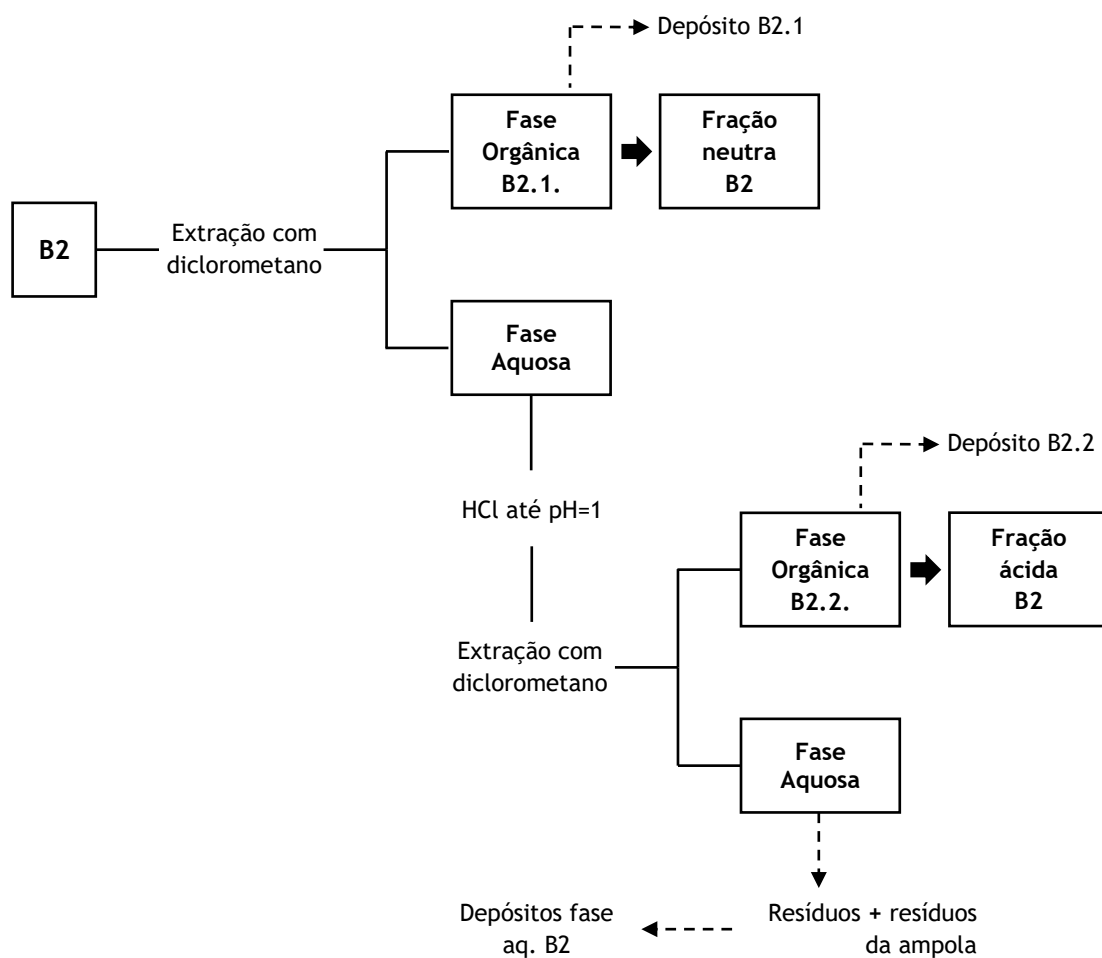


Figura 15 Organograma do procedimento experimental após saponificação de B2 e denominação das frações.

As fases orgânicas B1.1. e B2.1. (frações neutras) foram analisadas por IV e por GC-MS.

2.4.4. Metilação das frações ácidas

Às fases orgânicas B1.2. e B2.2 (frações ácidas), separadamente, foi adicionada uma solução de diazometano em éter etílico, em excesso. Durante 48 h foi-se adicionando mais solução de diazometano ao extrato até cessar a liberação de azoto. Esta reação foi realizada à temperatura ambiente. A evaporação do solvente ocorreu à pressão atmosférica, dentro da *hotte*.

As duas frações ácidas foram analisadas por GC-MS.

2.5. Determinação da atividade biológica

2.5.1. Atividade antioxidante - Método do DPPH

O método do DPPH para determinação da atividade antioxidante foi aplicado ao extrato obtido por refluxo de 4 horas com etanol/água (80/20).

Para determinar a atividade antioxidante pelo método colorimétrico com DPPH foi construída uma curva de calibração. Para tal preparou-se uma solução mãe de DPPH em metanol, com concentração 0,216 mM ou 85 mg/L. A partir desta solução prepararam-se diferentes diluições com concentrações definidas, que se encontram na Tabela 1.³⁷

Tabela 1 Concentrações das soluções metanólicas de DPPH utilizadas na construção da curva de calibração.

[DPPH] em mM	[DPPH] em mg/L
0,0108	4,25
0,0216	8,50
0,0432	17,00
0,0648	25,50
0,0864	34,00
0,1080	42,50
0,1296	51,00
0,1512	59,50
0,1739	68,43
0,1955	76,93
0,2160	85,00

Após a preparação das soluções acima indicadas, foi efetuada a leitura das absorvâncias destas a 517 nm contra um branco constituído apenas por metanol. As leituras das absorvâncias foram feitas em triplicado. A curva de calibração foi construída com as concentrações de DPPH, em mg/L, no eixo das abcissas enquanto que as absorvâncias lidas foram colocadas no eixo das ordenadas (Figura 16).³⁷

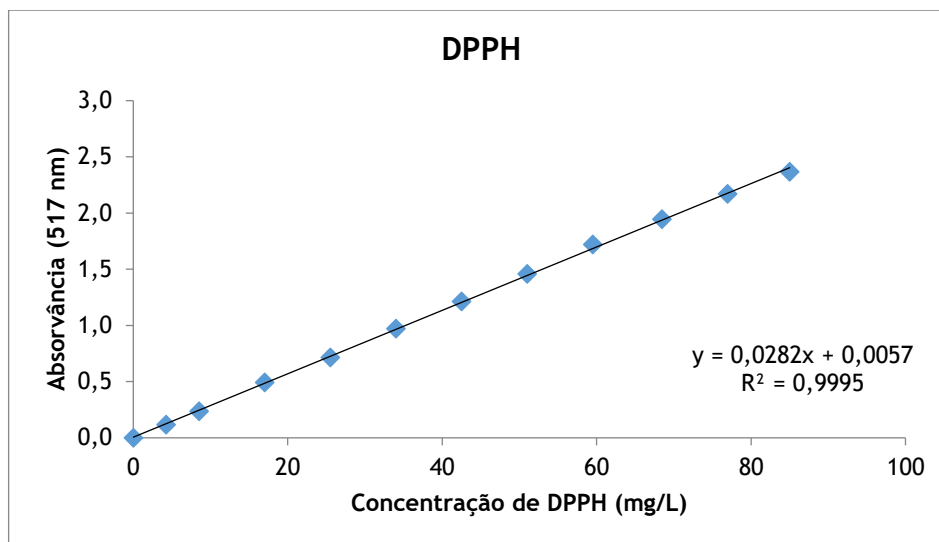


Figura 16 Curva de calibração do DPPH para determinação da atividade antioxidante, obtida a partir da média das leituras das absorvâncias em triplicado.

Para determinação da atividade antioxidante do extrato, por este método, prepararam-se três soluções de DPPH, em metanol, com concentração 0,2000, 0,1242 e 0,0800 mM. Todas as soluções de DPPH utilizadas foram preparadas diariamente, deixadas estabilizar e protegidas da luz, devido à sensibilidade do DPPH. Quanto ao extrato, prepararam-se diluições deste em metanol, com concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL.^{29,37}

Para cada solução de DPPH preparada e para cada concentração do extrato, efetuou-se o seguinte procedimento experimental: a 0,1 mL de amostra adicionaram-se 3,9 mL de solução de DPPH. Deixou-se incubar no escuro, à temperatura ambiente, durante 90 minutos e após estes leram-se as absorvâncias a 517 nm.^{29,37}

Para cada solução de DPPH foi preparado um controlo constituído por 0,1 mL de metanol e 3,9 mL de solução de DPPH, o qual foi submetido às mesmas condições das amostras em estudo. O branco continha apenas metanol. Os ensaios foram realizados em triplicado.^{29,37}

Após a determinação das absorvâncias calculou-se a percentagem de inibição, para cada amostra, com base na fórmula seguinte (1):

$$\% I = \frac{Abs_0 - Abs_1}{Abs_0} \times 100 \quad (1)$$

Onde Abs_0 é a absorvância do controlo aos 90 minutos e Abs_1 é a absorvância da amostra aos 90 minutos.^{29,37}

Após a determinação da % I calculou-se a IC_{50} , que é calculada a partir da linearidade obtida na representação gráfica da % I em função da concentração de amostra na célula do espectrofotómetro. Pela reta de calibração obtém-se a concentração de DPPH no controlo aos 90 minutos e a partir desta e da IC_{50} é calculado o AAI (2).^{29,37} Os gráficos correspondentes a esta determinação encontram-se discutidos no tópico dos resultados e discussão.

$$AAI = \frac{\text{concentração de DPPH no controlo aos 90 minutos } (\mu\text{g/mL})}{IC_{50} (\mu\text{g/mL})} \quad (2)$$

O valor de AAI obtido permite classificar a atividade antioxidante do extrato de acordo com as categorias da Tabela 2.^{29,37}

Tabela 2 Classificação de uma amostra quanto ao tipo de atividade antioxidante demonstrado.

Atividade Antioxidante	AAI
Pobre	AAI < 0,5
Moderada	0,5 < AAI < 1,0
Forte	1,0 < AAI < 2,0
Muito Forte	AAI > 2,0

Como o valor de AAI é calculado pelo quociente entre a concentração de DPPH no controlo aos 90 minutos e a IC_{50} , este apenas depende da massa de composto testada no ensaio e da massa de DPPH. Assim, o AAI é constante para cada composto, uma vez que é independente da concentração de DPPH e da amostra utilizada.^{29,37}

Para controlo positivo e como forma de comparação do AAI do extrato utilizaram-se compostos antioxidantes como padrão. Prepararam-se soluções metanólicas dos padrões: rutina, com as concentrações 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/mL; trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-3,4-dihidrocromeno-2-carboxílico), com as concentrações 5, 10, 25, 50, 75 e 100 mg/mL; ácido gálico, com as concentrações 10, 25, 50, 75, 100 e 150 mg/mL. O procedimento experimental utilizado para os padrões foi igual ao descrito anteriormente.^{29,37}

2.5.2. Atividade antioxidante - Sistema β -caroteno/ácido linoleico

A determinação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico foi realizada para o extrato obtido por refluxo de 4 horas com etanol/água (80/20).

Para determinar a atividade antioxidante pelo método do sistema β -caroteno/ácido linoleico foi necessário preparar diariamente uma emulsão. Para tal, adicionou-se 500 μ L de uma solução de β -caroteno em clorofórmio (20 mg/mL), 40 μ L de ácido linoleico, 400 μ L de Tween 40 e 1 mL de clorofórmio num balão de fundo redondo. A mistura foi homogeneizada e o clorofórmio foi evaporado utilizando o evaporador rotativo, a 45°C durante 5 minutos. Após a evaporação, sob agitação vigorosa e contínua, adicionou-se 100 mL de água Milli-Q saturada com oxigénio à mistura anterior.^{37,42,43}

Para determinação da atividade antioxidante do extrato, por este método, prepararam-se diluições deste em metanol, com concentrações de 5, 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 μ g/mL.

Para cada concentração do extrato, efetuou-se o seguinte procedimento experimental, num tubo de ensaio: a 5 mL da emulsão preparada anteriormente adicionou-se 300 µL de amostra. Para cada amostra foi preparado um controlo, onde se substituiu os 300 µL de amostra por metanol. Para o ensaio em branco utiliza-se uma emulsão sem B-caroteno. Assim, a emulsão para o branco foi preparada de modo idêntico à anterior, onde apenas se substituiu os 500 µL de solução de B-caroteno por 500 µL de clorofórmio.^{37,42}

O ensaio foi realizado em duplicado e as absorvâncias foram lidas a 470 nm, após uma hora de reação num banho a 50°C. A absorvância do controlo foi lida, ao tempo zero e ao fim de uma hora de reação, contra o branco.³⁷

Após a medição das absorvância, a atividade antioxidante foi calculada sob a forma de percentagem de inibição utilizando a fórmula seguinte (3):

$$\% I = \frac{Abs_{amostra}^{t=1} - Abs_{controlo}^{t=1}}{Abs_{controlo}^{t=0} - Abs_{controlo}^{t=1}} \times 100 \quad (3)$$

Onde $Abs_{amostra}^{t=1}$ é a absorvância da amostra após uma hora de reação, $Abs_{controlo}^{t=1}$ é a absorvância do controlo após uma hora de reação e $Abs_{controlo}^{t=0}$ é a absorvância do controlo ao tempo zero de reação.³⁷

Para controlo positivo utilizou-se o BHT como padrão. O procedimento experimental utilizado para o padrão foi igual ao descrito para a amostra. A atividade antioxidante da amostra foi comparada com a do padrão BHT, através da representação gráfica das percentagens de inibição em função das respetivas concentrações.³⁷

3. Resultados e Discussão

Nesta secção são apresentados os resultados obtidos para a caracterização fitoquímica do extrato de etanol/água (80/20) e do extrato de *n*-hexano e para a avaliação biológica, por determinação da atividade antioxidante do extrato de etanol/água (80/20). Para além dos resultados finais, são ainda apresentadas as considerações tecidas ao longo das diversas técnicas realizadas.

Como o extrato de etanol/água e o extrato de *n*-hexano foram estudados separadamente e as estratégias aplicadas na sua investigação foram diferentes, os resultados e a sua discussão são apresentados seguindo o esquema da seção parte experimental.

3.1. Extrato etanol/água (80/20)

3.1.1. Quantificação dos fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais é relevante, uma vez que os antioxidantes isolados das plantas são maioritariamente polifenóis, sendo este grupo determinante para atividade antioxidante do extrato. A capacidade antioxidante desta classe de compostos deve-se, essencialmente, às suas propriedades redox, o que os leva a atuar como agentes redutores ou como doadores de átomos de hidrogénio.^{38,39}

A quantificação dos fenóis totais foi efetuada a partir da curva de calibração realizada com o padrão ácido gálico (Figura 12). O teor total de fenóis calculado foi $413,2 \pm 4,8$ mg EAG/g matéria seca e resulta da média dos ensaios em triplicado. Este resultado demonstra que o extrato tem um elevado conteúdo fenólico.

O teor de fenóis totais do *Salix salviifolia* subsp. *salviifolia* calculado é superior a resultados obtidos para outras espécies do género *Salix*, que se encontram descritos na literatura. Alam e colaboradores⁵, concluíram que os extratos etanólicos de flores de *Salix caprea*, continham $207 \pm 6,1$ mg/g EAG. Enquanto que Enayat e colaboradores⁹, realizaram um estudo comparativo entre extratos de folhas, cascas e flores de *Salix aegyptiaca*, provenientes de diferentes solventes de extração, e concluíram que o extrato com maior conteúdo fenólico foi o extrato etanólico das cascas que continha 212 ± 4 mg EAG/g matéria seca.

Os resultados referidos anteriormente, que se encontram descritos na literatura, também foram obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu, mas com algumas variações comparativamente ao utilizado neste trabalho.

3.1.2. Quantificação dos flavonoides totais

Atendendo a que os flavonoides são das classes de compostos fenólicos naturais mais diversa e difundida no reino vegetal, a determinação do seu teor assume um papel importante e pertinente. Os flavonoides são responsáveis por diversas atividades biológicas e químicas, como a atividade antioxidante por eliminação de radicais livres. Contudo, nem todas as estruturas dos flavonoides possuem iguais propriedades antioxidantes, uma vez que a posição do substituinte hidroxilo e a própria estrutura da molécula influenciam a capacidade antioxidante da mesma. Estes compostos podem quelar ou interferir no processo de eliminação de radicais livres, contribuindo para a sua supressão.³⁸⁻⁴⁰

A quantificação dos flavonoides totais foi efetuada a partir da curva de calibração realizada com o padrão quercetina (Figura 13). O teor de flavonoides calculado foi $6,4 \pm 1,6$ mg EQ/g matéria seca e resulta da média dos ensaios em quintuplicado. O resultado obtido demonstra que o extrato tem um teor de flavonoides relativamente baixo.

O teor de flavonoides totais do *Salix salviifolia* subsp. *salviifolia* calculado é muito inferior a resultados obtidos para outras espécies do género *Salix*, que se encontram descritos na literatura. Enayat e colaboradores⁹, num estudo comparativo que realizaram entre extratos de folhas, cascas e flores de *Salix aegyptiaca*, provenientes de diferentes solventes de extração, concluíram que o extrato com maior conteúdo de flavonoides totais foi o extrato etanólico das cascas que continha 479 ± 4 mg equivalentes de catequina/g matéria seca. Quanto ao extrato com menor teor de flavonoides, o extrato de ciclohexano das folhas apenas apresentou 2 ± 1 mg equivalentes de catequina/g matéria seca. De entre os extratos originados das cascas, o que apresentou o menor teor de flavonoides foi o obtido com ciclohexano (73 ± 5 mg equivalentes de catequina/g matéria seca).⁹

Os resultados referidos anteriormente, que se encontram descritos na literatura, são bastante diferentes dos obtidos neste trabalho, o que pode estar relacionado com o facto do método utilizado ser diferente, bem como a expressão dos resultados, onde o padrão utilizado para efetuar a curva de calibração não é o mesmo.

3.1.3. Fracionamento do extrato bruto

O fracionamento do extrato bruto foi efetuada com o objetivo de isolar os compostos presentes na amostra, de forma a obter produtos puros. Com vista à sua concretização, e tendo por base o pressuposto de que os compostos presentes no extrato de etanol/água são relativamente polares, realizou-se um estudo dos possíveis eluentes a utilizar na CC. Através do mesmo, pôde concluir-se que a fase móvel da CC começaria com clorofórmio, aumentando-se gradualmente

a polaridade através de uma mistura clorofórmio/acetato de etilo (90/10), à qual se seguiu clorofórmio/metanol (95/5), clorofórmio/metanol (50/10) e por fim um eluente constituído apenas por metanol.

Cada processo de fracionamento foi iniciado com, aproximadamente, 1 g, tendo este sido repetido até à obtenção de uma massa considerável de cada fração, perfazendo um total de 8,643 mg de extrato bruto fracionado. Nesta fase não foi possível obter-se produtos puros, sendo aceitável a obtenção de misturas com menor número de compostos.

As frações recolhidas no fracionamento anterior foram combinadas dando origem a 5 frações principais (frações de I a V) com vista ao subfracionamento. Na Tabela 3, encontra-se o registo das massas obtidas no fracionamento, na qual se pode observar que a massa de extrato submetido a fracionamento é menor que a massa total obtida nas frações. Este resultado pode ser justificado pelo facto de o metanol dissolver a sílica, o que leva a que as frações contenham vestígios de sílica, o que neste caso foi observado sobretudo na fração IV.

Tabela 3 Registo das massas das frações de I a V, da massa total de extrato bruto submetido a fracionamento (total de extrato) e da massa total obtida nas frações (total das frações).

	Massa (g)
Fração I	0,024
Fração II	0,047
Fração III	0,066
Fração IV	10,936
Fração V	0,343
Total de extrato	8,643
Total das frações	11,416

A fração V foi submetida a subfracionamento por CC utilizando-se como fase móvel um conjunto de eluentes diferente dos utilizados no fracionamento do extrato bruto, com o objetivo de separar os produtos e purificá-los, o que acabou por não ser possível. Assim, as frações recolhidas foram combinadas originando 11 frações finais.

A fração IV foi trabalhada com a mesma finalidade, mas também não se conseguiu isolar os compostos presentes na amostra, sendo recolhidas 12 frações finais.

As frações combinadas a partir do fracionamento da fração IV e V e as frações I, II e III foram analisadas por CCF e pôde concluir-se que algumas destas frações continham os mesmos compostos pelo que foram recombinaadas. No total foram obtidas 18 frações com diferentes misturas de compostos, as quais se encontram sintetizadas e identificadas na Tabela 4, com as respetivas massas obtidas. Os processos de CC encontram-se por ordem cronológica e as frações estão ordenadas por ordem crescente de polaridade.

A nível de quantidade obtida, a massa total das frações finais foi inferior à massa total das frações obtidas após o fracionamento do extrato bruto. Este resultado pode dever-se ao facto de a fração IV conter enormes vestígios de sílica e após o seu subfracionamento, apesar da utilização de metanol neste, foi possível obter frações sem quantidades significativas de sílica. Para além disso, não foi possível determinar a massa da fração O, pois esta resultou da aplicação de água como fase móvel e não se conseguiu evaporar à secura, contendo, portanto, os produtos em água.

Tabela 4 Síntese das frações obtidas, da sua constituição e massa, após o fracionamento do extrato e o subfracionamento das frações IV e V.

Fração	Fracionamento do extrato bruto	Subfracionamento da fração V	Subfracionamento da fração IV	Massa obtida (g)
I	x	x	x	0,079
II	x	—	x	0,047
A	—	x	x	0,020
B	—	x	x	0,016
III	x	x	x	0,112
C	—	x	—	0,025
D	—	x	—	0,002
E	—	x	—	0,010
F	—	x	—	0,007
G	—	x	—	0,007
H	—	x	—	0,036
I	—	—	x	0,005
J	—	—	x	6,398
K	—	—	x	0,008
L	—	—	x	0,004
M	—	—	x	0,067
N	—	—	x	0,015
O	—	—	x	ND
Total				6,858

O símbolo x é utilizado para indicar a origem das frações que constituem a fração final e ND (não definida) significa que não foi possível obter a massa desta fração.

No fracionamento do extrato bruto a fração IV e V foram obtidas após a I, a II e a III, mas com o seu subfracionamento algumas misturas de compostos obtidas demonstraram ser idênticas às frações resultantes da separação do extrato. Este facto não apresenta uma explicação concreta, mas pode dever-se a uma degradação dos produtos presentes na fração.

Assim, esta estratégia de separação não permitiu atingir o objetivo, uma vez que a maioria dos compostos nas placas de CCF apresentaram grandes arrastamentos não sendo possível definir quantos produtos se encontravam em cada fração. Estes resultados levaram a que esta técnica

não fosse viável para o extrato em estudo, sendo considerado inconclusivo e inviável prosseguir-la. Assim, foram abraçadas outras estratégias, as quais serão referidas de seguida.

3.1.4. Metilação do extrato bruto

Com a adição de uma solução de diazometano em éter dietílico ao extrato bruto esperava-se que ocorresse a metilação dos ácidos carboxílicos livres, formando ésteres metílicos. Esta alteração estrutural foi monitorizada por IV e por RMN em DMSO- d_6 , sendo verificadas alterações a nível dos grupos funcionais.

A metilação funciona como uma derivatização e permite que a amostra possa ser injetada no GC-MS, sem ocorrer retenção na coluna presente no cromatógrafo. Assim, recorreu-se a esta técnica para se proceder à identificação dos compostos presentes na amostra. Para tal, adicionou-se diclorometano à amostra de forma a dissolvê-la para a análise, contudo a dissolução total não foi possível. Assim, a identificação dos compostos não pode ser considerada totalmente fiável, uma vez que apenas a parte dissolvida pôde ser analisada e identificada. Posto isto, esta estratégia de trabalho tornou-se infrutífera, o que levou a adoção de outras.

A Tabela 5 regista os compostos que conseguiram ser detetados por GC-MS, a sua abundância relativa e os tempos de retenção. Para além disso também são indicadas as percentagens de compostos identificados e de compostos não identificados (NI).

Tabela 5 Compostos detetados na amostra de extrato bruto, após metilação com diazometano, por GC-MS e os tempos de retenção (T.R.) e abundância relativa (%), respetivos.

Composto	T.R. (min.)	Percentagem (%)
Tricosano	37,593	1,523
Hexadecanoato de metilo (Palmitato de metilo)	38,320	2,570
Icosano	39,989	2,365
Docosano	46,205	2,195
Heptacosano	50,866	3,293
Octacosano	53,641	2,431
Heptacosan-1-ol	55,360	22,038
Docosanoato de metilo	55,806	7,391
Triacotano	57,830	17,623
Tetracosanoato de metilo	58,073	8,973
3 β -Acetoxiestigmasta-5,22-dieno (Acetato de estigmasterol)	61,831	1,714
Total NI		27,225
Total Identificados		72,116

Os compostos identificados são maioritariamente hidrocarbonetos, sendo que alguns destes são ácidos gordos esterificados com um grupo metilo. Assim, os compostos mais abundantes nesta análise foram o tetracosanoato de metilo, o triacontano e o heptacosan-1-ol.

3.1.5. Acetilação do extrato bruto sem catalisador

A acetilação com anidrido acético e acetato de sódio, protege os grupos hidroxilo livres com um grupo acetato. Nesta reação, não foi utilizado nenhum catalisador para aumentar a taxa de acetilação, sendo por isso denominada de acetilação do extrato bruto sem catalisador.

A reação foi iniciada com 0,503 g de extrato e após a acetilação obteve-se 1,030 g de produto. Este aumento de massa pode dever-se à passagem dos grupos hidroxilo a grupos acetato.

O produto final obtido foi submetido a fracionamento por CC com o objetivo de isolar os compostos presentes na amostra, para posterior identificação. Como resultado deste processo cromatográfico foram obtidas 18 frações e, posteriormente, com a lavagem da sílica com acetato de etilo e água, obtiveram-se mais duas frações. Na tabela 6 encontram-se as frações recolhidas durante CC e as combinações realizadas, assim, como a massa de cada fração. Para a fração que resultou da adição de água à sílica não foi possível obter a sua massa, uma vez que não se conseguiu evaporar à secura.

Inicialmente, na coluna foram colocadas 1,030 g de extrato acetilado, mas após a recolha das frações e lavagem da sílica, a massa obtida foi muito inferior à inicial. Este facto pode dever-se à retenção de composto na sílica, o que não permitiu a sua eluição. A retenção pode ser consequência de uma forte interação entre estes e a sílica, podendo indicar que os compostos são extremamente polares, o que significa que a acetilação não ocorreu de forma eficiente. Outro inconveniente que este processo cromatográfico apresentou foi a impossibilidade de isolar os compostos presentes na amostra.

Tabela 6 Frações combinadas obtidas na CC e respetivas massas e massa total de produtos recolhidos nas frações.

Frações	Massa (g)
1-3	0,001
4	0,002
5-6	0,002
7	0,002
8-12	0,003
13-25	0,016
26-36	0,040

37-49	0,045
50-74	0,053
75-93	0,021
94-102	0,046
103-109	0,035
110-124	0,033
125-153	0,027
154-121	0,028
182-184	0,011
185-246	0,173
247-250	0,008
Sílica + Acetato de etilo	0,014
Sílica + Água	ND
Total	0,560

Com o tipo de frações obtidas, a massa total recolhida e possibilidade de a reação de acetilação ter sido ineficiente, optou-se por não se proceder a nenhum tipo de análise às frações.

3.1.6. Acetilação do extrato bruto com catalisador

A acetilação com anidrido acético, DMAP e trietilamina é descrita como bastante eficiente, uma vez que a utilização de DMAP aumenta a eficácia da acetilação, pois funciona como catalisador da reação.²⁴

A Acetilação I foi iniciada com 100 mg de extrato bruto e após acetilação obteve-se 247 mg de produto, enquanto que a reação Acetilação II partiu de 305 mg de extrato bruto, das quais se obteve 1,732 g. Estes aumentos de massa devem-se à passagem dos grupos hidroxilo presentes a grupos acetato. Esta alteração estrutural foi monitorizada por IV no caso da Acetilação I, sendo registadas alterações a nível dos grupos funcionais.

Os dois produtos da acetilação foram analisados separadamente por GC-MS e os cromatogramas obtidos foram comparados, tendo em conta os compostos presentes em cada Acetilação, os seus tempos de retenção e a sua abundância relativa (Tabela 7).

Tabela 7 Comparação da composição química, abundância relativa e tempos de retenção das componentes das amostras Acetilação I e Acetilação II. (t - traços: componentes vestigiais)

Composto	Acetilação I	Acetilação II
	T.R. (min.) Porcentagem (%)	T.R. (min.) Porcentagem (%)
Acetato de 1-acetiloxietilo	5,913 0,547 %	5,590 t
N,N-Dietilacetamida	9,183 17,151 %	9,179 4,281 %
Pentano-2,4-diona	—	10,335 0,952 %
2,6-Dimetilpiran-4-ona	—	17,974 3,297 %
N,N-Dietil-3-oxobutanamida	—	18,486 0,428 %
3-Acetil-6-metilpiran-2,4-diona	—	22,809 19,248 %
3-Acetil-2,6-dimetilpiran-4-ona	—	24,256 9,760 %
3,5-Diacetil-2,6-dimetilpiran-4-ona	—	29,427 5,047 %
1,2,3,4-Tetra-O-acetil-D-lixopirano	40,776 4,902 %	40,798 1,545 %
Penta-O-acetil-sorbopirano	40,888 2,551 %	40,907 0,469 %
1,2,3,4,6-Penta-O-acetil-D-glucopirano	41,352 7,107 %	41,366 1,802 %
1,2,3,4,6-Penta-O-acetil-D-gulopirano (α ou β)	41,610 9,745 %	—
1,2,3,4,6-Penta-O-acetil-D-manopirano	—	41,617 2,418 %
1,2,3,4,5,6-Hexa-O-acetil-epi-inositol	43,009 0,372 %	—
Hexa-O-acetil-D-mannitol	43,433 0,206 %	—
5-Hidroxi-8-metoxipsoraleno	—	44,678 1,648 %
1,2,3,4,6-Penta-O-acetil-D-gulopirano (α ou β)	46,578 0,273 %	—
Peracetato de soforose	56,403 0,133 %	—
Peracetato de gentiobiose	57,036 0,144 %	—
Peracetato de melibiose	57,244 0,109 %	—
Pentaacetato de salicólsalicina	58,939 0,181 %	59,693 2,287 %
Pentaacetato de arbutina	59,110 0,128 %	—
Tetra-O-acetil-yuheinoside	59,670 9,624 %	—
2,3,4,6-Tetra-O-acetil-O-cresol-β-D-glucopirano	61,328 0,330 %	—
Peracetato de kojibiose	61,635 0,223 %	—
Octa-O-acetilsacarose	62,355 27,495 %	62,367 8,134 %

Estigmasterol	66,018 0,398 %	—
B-Dihidrofucosterol	67,376 1,175 %	—
Acetato de aplisterilo	68,897 0,162 %	—
Total NI	15,921	38,069
Total Identificados	82,956	61,816

Em ambas as Acetilações, os compostos identificados são maioritariamente monossacáridos e dissacáridos acetilados, sendo que também estão presentes alguns glicósidos. Assim, o composto mais abundante, nestas duas amostras, foi a octa-O-acetilsacarose. Para além de glúcidos, as amostras contêm lactonas, esteroides e furanocumarinas. A nível de compostos da família dos salicilatos foi detetada a salicoilsalicina.

A Acetilação I e a Acetilação II foram fracionadas por CC separadamente. As frações obtidas foram analisadas e comparadas por CCF, o que permitiu concluir que algumas continham os mesmos compostos pelo que foram recombinações, o que resultou na obtenção de 32 frações finais (A1 à A32). A constituição de cada fração e a respetiva massa encontra-se registada na tabela 8.

Tabela 8 Constituição de cada fração resultante da Acetilação I e Acetilação II e respetiva massa. A massa total de produtos recolhidos nas frações também se encontra indicada.

Fração	Acetilação II	Acetilação I	Massa obtida (g)
A1	1-2	1-7	0,011
A2	3	—	0,003
A3	4	8-9	0,007
A4	5-7	—	0,228
A5	8-9	10-16	0,020
A6	10-12	17-31	0,029
A7	13-16	—	0,050
A8	17-20	—	0,028
A9	21-34	—	0,021
A10	35-42	—	0,019
A11	43-46	—	0,070
A12	47-60	—	0,078
A13	61-62	—	0,013
A14	63	—	0,009
A15	64-68	—	0,024
A16	69-78	—	0,078
A17	79-80	—	0,066
A18	81	—	0,036
A19	82-84	—	0,053
A20	85-90	—	0,028
A21	—	32-43	0,024
A22	—	44-50	0,018

A23	—	51-73	0,040
A24	—	74	0,007
A25	—	75-76	0,013
A26	—	77-79	0,011
A27	—	80-93	0,015
A28	91-92	94-101	0,086
A29	93-99	10-103	0,158
A30	100	104	0,017
A31	101	105-106	0,270
A32	102-105	107-109	0,089
Total			1,619

Inicialmente, realizou-se a CC da Acetilação II, onde foram fracionadas 1,553 g de extrato acetilado, e posteriormente efetuou-se a CC da Acetilação I com 214 mg de extrato acetilado. No final, a massa total resultante das acetilações do extrato foi 1,767 g, o que é superior à massa de frações obtida, após o fracionamento. Esta diferença pode dever-se à retenção de alguns compostos na coluna, como por exemplo, os reagentes em excesso, que apesar da extração e da co-evaporação efetuadas após a reação de acetilação continuavam junto ao extrato acetilado. Para além dos reagentes em excesso, também pode ter ocorrido a retenção de alguns componentes do extrato. Algumas frações recolhidas continham vestígios de sílica devido à utilização de metanol na eluição.

Algumas frações resultantes foram analisadas por RMN em CDCl₃, como por exemplo as frações A4, A7 e A11. Nestas três frações foi possível identificar estruturalmente três compostos, os quais se encontram referidos de seguida. Os espectros de RMN-¹H, de RMN-¹³C e as correlações de HSQC e HMBC dos compostos encontram-se no Anexo I.

Na fração A4 (5-7) foi identificada a 3-Acetil-3-hidroxi-6-metil-piran-2,4-diona, por RMN (Figura 17).

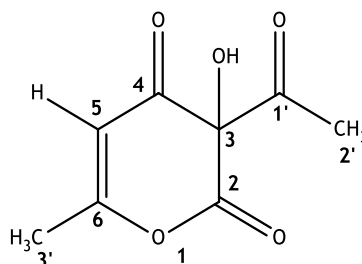


Figura 17 Estrutura da 3-Acetil-3-hidroxi-6-metil-piran-2,4-diona e numeração das posições, atribuída para a análise durante a identificação estrutural.

O espectro de RMN de ¹H apresentou no total três singletos, um a δ 5,92 e dois a δ 2,64 e 2,25 correspondentes aos dois grupos metilo. No espectro de RMN de ¹³C foram detetados oito sinais. A δ 30,19 e a δ 20,82 foram detetados os sinais de C-2' e C-3', respetivamente. Os sinais δ 205,37; 181,20; 169,20; 161,38; 101,57 e 99,98 correspondem, respetivamente, aos carbonos

quaternários (Cq) C-1', C-4, C-6, C-2, C-5 e C-3. Pelas correlações de HSQC, pode observar-se que o próton a δ 5,92 se correlaciona com o carbono δ 101,57 (C-5) e que os prótons a δ 2,64 e 2,25 se correlacionam com os carbonos a δ 30,19 (C-2') e a δ 20,82 (C-3'), respectivamente. As correlações observadas no espectro bidimensional HMBC corroboram a estrutura apresentada na figura 17. Observam-se correlações entre o próton do C-5 e os átomos de carbono quaternários C-3, C-6 e C-4, assim como com o carbono C-3'. Os prótons do C-2' apresentaram correlações com os carbonos quaternários C-3 e C-1', enquanto que os prótons de C-3' se correlacionaram com C-5 e C-6. Esta análise encontra-se sintetizada na tabela 9.

Tabela 9 Dados de RMN de ^1H (δ em ppm, multiplicidade), de RMN de ^{13}C (δ ppm) e correlações HSQC e HMBC para o composto 3-Acetil-3-hidroxi-6-metil-piran-2,4-diona.

Posição	RMN de ^1H δ_{H}	RMN de ^{13}C δ_{C}	Correlações HSQC	Correlações HMBC
1	—	—	—	—
2	—	161,38	—	—
3	—	99,98	—	—
4	—	181,20	—	—
5	5,92 (s) (<u>H</u>)	101,57	5- <u>C</u> H	3-Cq 4-Cq 6-Cq 3'- <u>C</u> H ₃
6	—	169,20	—	—
1'	—	205,37	—	—
2'	2,64 (s) (CO <u>C</u> H ₃)	30,19	2'- <u>C</u> H ₃	3-Cq 1'-Cq
3'	2,25 (s) (<u>C</u> H ₃)	20,82	3'- <u>C</u> H ₃	5- <u>C</u> H 6-Cq

Na fração A7 (13-16) foi identificado, por RMN, o Ácido (*E*)-2-acetil-3-hidroxibut-2-enóico (Figura 18).

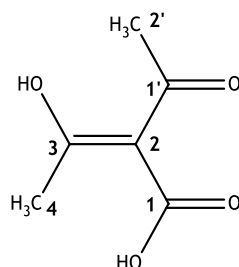


Figura 18 Estrutura do Ácido (*E*)-2-acetil-3-hidroxibut-2-enóico e numeração das posições, atribuída para a análise durante a identificação estrutural.

O espectro de RMN de ^1H apresentou no total dois singletos, um δ 2,50 e o outro a δ 2,32 correspondentes aos dois grupos metilo. No espectro de RMN de ^{13}C foram detectados seis sinais. A δ 31,95 e a δ 18,74 foram detectados os sinais de C-2' e C-4, respectivamente. Os sinais δ 199,86; 175,22; 166,61 e 127,57 correspondem, respectivamente, aos carbonos quaternários C-1', C-1, C-3, e C-2. Pelas correlações de HSQC, pode observar-se que o próton a δ 2,50 se correlaciona com o carbono δ 31,95 (C-2') e que o próton a δ 2,32 se correlaciona com o carbono a δ 18,74 (C-4). As correlações observadas no espectro bidimensional HMBC corroboram a estrutura apresentada na figura 18. Observam-se correlações entre o próton do C-4 e os átomos de carbono quaternários C-3 e C-2. Os prótons do C-2' apresentaram correlações com os carbonos quaternários C-2 e C-1'. Esta análise encontra-se sintetizada na tabela 10.

Tabela 10 Dados de RMN de ^1H (δ em ppm, multiplicidade), de RMN de ^{13}C (δ ppm) e correlações HSQC e HMBC para o composto Ácido (E)-2-acetil-3-hidroxi-2-butenoico.

Posição	RMN de ^1H δ_{H}	RMN de ^{13}C δ_{C}	Correlações HSQC	Correlações HMBC
1	—	175,22	—	—
2	—	127,57	—	—
3	—	166,61	—	—
4	2,32 (s) (COCH_3)	18,74	4- $\underline{\text{CH}_3}$	2-Cq 3-Cq
1'	—	199,86	—	—
2'	2,50 (s) (CH_3)	31,95	2'- $\underline{\text{CH}_3}$	2-Cq 1'-Cq

Na fração A11 (43-46) foi identificada a 3-Acetil-3,6-dimetil-piran-2,4-diona, por RMN (Figura 19).

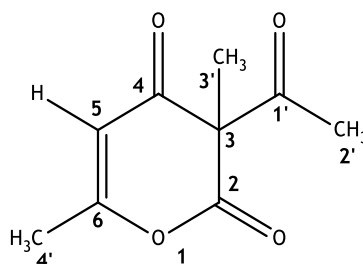


Figura 19 Estrutura da 3-Acetil-3,6-dimetil-piran-2,4-diona e numeração das posições, atribuída para a análise durante a identificação estrutural.

O espectro de RMN de ^1H apresentou no total quatro singletos, um a δ 6,07 e três a δ 2,46; 2,28 e 2,19 correspondentes aos três grupos metilo. No espectro de RMN de ^{13}C foram detectados nove sinais. A δ 31,85, a δ 19,51 e a δ 18,69 foram detectados os sinais de C-2', C-4' e C-3', respectivamente. Os sinais δ 200,52; 177,37; 167,17; 164,94; 126,47 e 114,78 correspondem, respectivamente, aos Cq C-1', C-4, C-2, C-6, C-3 e C-5. Pelas correlações de HSQC, pode

observar-se que o próton a δ 6,07 se correlaciona com o carbono δ 114,78 (C-5) e que os prótons a δ 2,46; 2,28 e 2,19 se correlacionam com os carbonos a δ 31,85 (C-2'), a δ 18,69 (C-3') e a δ 19,51 (C-4'), respectivamente. As correlações observadas no espectro bidimensional HMBC corroboram a estrutura apresentada na figura 19, apesar de não se observarem todas as correlações esperadas. Observam-se correlações entre o próton do C-5 e os átomos de carbono quaternários C-3, C-6 e C-4'. Os prótons do C-2' apresentaram correlações com o carbono C-1', enquanto que os prótons de C-3' se correlacionaram com C-2 e C-3. No caso dos prótons de C-4', estes correlacionam-se com o carbono C-5 e com o C-6. Esta análise encontra-se sintetizada na tabela 11.

Tabela 11 Dados de RMN de ^1H (δ em ppm, multiplicidade), de RMN de ^{13}C (δ ppm) e correlações HSQC e HMBC para o composto 3-Acetil-3,6-dimetil-piran-2,4-diona.

Posição	RMN de ^1H δ_{H}	RMN de ^{13}C δ_{C}	Correlações HSQC	Correlações HMBC
1	—	—	—	—
2	—	167,17	—	—
3	—	126,47	—	—
4	—	177,37	—	—
5	6,07 (s) (<u>H</u>)	114,78	5- <u>CH</u>	3-Cq 6-Cq 4'- <u>CH</u> ₃ a
6	—	164,94	—	—
1'	—	200,52	—	—
2'	2,46 (s) (CO <u>CH</u> ₃)	31,85	2'- <u>CH</u> ₃	1'-Cq a
3'	2,28 (s) (<u>CH</u> ₃)	18,69	3'- <u>CH</u> ₃	2-Cq 3-Cq a
4'	2,19 (s) (<u>CH</u> ₃)	19,51	4'- <u>CH</u> ₃	5- <u>CH</u> 6-Cq

^a Faltam correlações.

De acordo com a estrutura, nas correlações de HMBC, o próton do átomo de carbono C-5 também se deveria correlacionar com C-4, o que não é possível de observar. Para além desta falha, também não se verifica a correlação entre os prótons de C-2' com o C-3. Outra correlação que não é apresentada no espectro é a existente entre os prótons do C-3' e os carbonos C4 e C-1'. O facto de estas correlações não serem possíveis de observar, no espectro de HMBC, pode dever-se à estrutura do composto, uma vez que este apresenta três grupos volumosos muito próximos.

3.2. Extrato *n*-hexano

3.2.1. Processo de separação

A adição de metanol ao extrato de *n*-hexano e consequente aquecimento proporcionou a separação dos componentes da amostra. Este processo originou três fases, as quais foram separadas. As massas de cada fase foram determinadas e registadas (Tabela 12).

Tabela 12 Fases obtidas e respetivas massas.

	Massa (g)
Fase superior	1,250 g
Fase intermédia (B1)	0,871 g
Fase inferior (B2)	2,764 g

Com o aquecimento do extrato de *n*-hexano em metanol ocorreu a dissolução dos componentes presentes. Após o aquecimento, adicionou-se metanol e deixou-se repousar, o que levou à deposição das ceras nas fases intermédia e inferior. Na fase superior ficaram os restantes compostos, como os ácidos gordos, hidrocarbonetos, esteróis e outros triterpenos.

3.2.2. Fracionamento da fase superior

O fracionamento da fase superior foi efetuado com o objetivo de isolar os compostos presentes nesta, numa tentativa de os obter purificados. Como resultado deste processo cromatográfico foram obtidas 24 frações e posteriormente, com a lavagem da sílica com metanol, obteve-se mais uma fração. Na tabela 13 encontram-se as frações recolhidas durante CC e as combinações realizadas, assim como a massa de cada fração e a massa total.

Tabela 13 Frações combinadas obtidas na CC e respetivas massas e massa total de produtos recolhidos nas frações.

Frações	Massa (g)
1-4	0,024
5	0,031
6-8	0,129
9-12	0,124
13-15	0,086

16-21	0,060
22-23	0,021
24-28	0,029
29-38	0,029
39-49	0,025
50-56	0,026
57-61	0,022
62-73	0,030
74-94	0,044
95-105	0,027
106-112	0,013
113-116	0,026
117-131	0,041
132-133	0,009
134-156	0,089
157-197	0,083
198-206	0,072
207-226	0,081
227-237	0,009
Sílica + Metanol	0,365
Total	1,495

Inicialmente, na coluna foram colocadas 1,250 g. Após a recolha das frações e posterior lavagem da sílica, a massa obtida foi superior à inicial. Este resultado deve-se à sílica que se encontra presente na fração originada pela sua lavagem com o metanol.

Algumas das frações obtidas foram analisadas por RMN em CDCl_3 , como forma de controlo no sentido de se realizar uma análise preliminar da composição destas antes de serem injetadas no GC-MS. Este estudo permitiu avaliar quais as frações que avançariam diretamente para análise por GC-MS, enquanto outras necessitaram de ser metiladas com uma solução de diazometano em éter etílico. Consequentemente, as frações que seguiram para análise por GC-MS foram as seguintes: 6-8, 9-12, 13-15, 16-21, 22-23 e a 39-49, das quais a 16-21 sofreu metilação. Respetivamente, nas tabelas 14 a 19 encontram-se os compostos detetados por GC-MS em cada fração analisada, a sua abundância relativa e os tempos de retenção. Para além disso, também são indicadas as percentagens totais de compostos identificados e de compostos não identificados.

Tabela 14 Compostos detetados na fração 6-8, resultante do fracionamento da fase superior, por GC-MS e respectivos tempos de retenção (T.R.) e abundância relativa (%).

Compostos: fração 6-8	T.R. (min.)	Percentagem (%)
6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona	36,239	2,758
14-Metilpentadecanoato de metilo (Isopalmitato de metilo)	38,253	0,782
Ácido octadeca-9,12-dienóico (Ácido linoleico)	44,110	0,755
Docosanoato de metilo	55,792	0,345
Docosan-1-ol	55,969	0,099
Tetracosanoato de metilo	58,071	0,180
γ -Tocoferol	62,069	0,800
Acetato de aplisterilo	62,728	0,387
α -Tocoferol (Vitamina E)	63,397	0,452
3-Oxours-12-eno (α -Amirenona)	68,578	2,530
Acetato de epiaplisterilo	69,019	2,235
α -Amirina	69,378	8,568
Estigmasta-3,5-dien-7-ona (Tremulona)	69,824	3,742
Friedelan-3-ona (Friedelina)	71,697	0,590
Friedelan-3-ol (Friedelanol)	72,615	2,934
Friedelanona	73,599	11,009
Olean-12-en-11-ona	93,033	18,225
Total NI		40,373
Total Identificados		56,391

Tabela 15 Compostos detetados na fração 9-12, resultante do fracionamento da fase superior, por GC-MS e respectivos tempos de retenção (T.R.) e abundância relativa (%).

Compostos: fração 9-12	T.R. (min.)	Percentagem (%)
6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona	36,312	1,143
Docos-1-ene	55,376	1,485
Acetato de aplisterilo	62,744	0,778
α -Tocoferol (Vitamina E)	63,434	0,507
β -Amirina	68,107	5,432
α -Amirina	69,463	50,854
Estigmast-4-en-3-ona (Sitostenone)	71,005	1,464
Moretenol	76,552	9,179
Total NI		27,700
Total Identificados		70,842

Tabela 16 Compostos detetados na fração 13-15, resultante do fracionamento da fase superior, por GC-MS e respectivos tempos de retenção (T.R.) e abundância relativa (%).

Compostos: fração 13-15	T.R. (min.)	Percentagem (%)
6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona	36,261	3,366
Ácido hexadecanóico (Ácido palmítico)	39,687	2,309
Ácido octadec-9-anóico	42,820	t
Docosan-1-ol	55,375	1,353
Acetato de aplisterilo	62,734	1,110
α -Tocoferol (Vitamina E)	63,417	2,448
β -Dihidrofucosterol	67,410	34,132
α -Amirina	69,327	7,971
Moretenol	76,588	0,924
Total NI		46,261
Total Identificados		53,613

Tabela 17 Compostos detetados na fração 16-21, resultante do fracionamento da fase superior, por GC-MS e respectivos tempos de retenção (T.R.) e abundância relativa (%).

Compostos: fração 16-21	T.R. (min.)	Percentagem (%)
Dodecanoato de metilo	27,680	t
Tetradecanoato de metilo	33,234	1,738
Pentadecanoato de metilo	35,801	1,143
6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona	36,273	0,559
Hexadecanoato de metilo (Palmitato de metilo)	38,262	30,376
Heptadecanoato de metilo	40,778	0,626
Octadec-9-enoato de metilo	42,821	0,749
Octadecanoato de metilo	43,656	1,638
Icosanoato de metilo	51,740	t
Docosanoato de metilo	55,822	0,464
Tricosanoato de metilo	57,090	t
Tetracosanoato de metilo	58,120	t
β -Dihidrofucosterol	67,359	60,500
Estigmasta-3,5-dien-7-ona (Tremulona)	69,590	t
Total NI		2,207
Total Identificados		97,793

Tabela 18 Compostos detetados na fração 22-23, resultante do fracionamento da fase superior, por GC-MS e respectivos tempos de retenção (T.R.) e abundância relativa (%).

Compostos: fração 22-23	T.R. (min.)	Percentagem (%)
Icos-9-ene	46,039	2,244
Docosanoato de metilo	55,820	1,603
Tetracosanoato de metilo	58,085	1,435
Acetato de epiaplisterilo	60,735	2,396
Acetato de aplisterilo	62,731	33,304
β -Dihidrofucosterol	67,542	3,139
Total NI		53,712
Total Identificados		44,121

Tabela 19 Compostos detetados na fração 39-49, resultante do fracionamento da fase superior, por GC-MS e respectivos tempos de retenção (T.R.) e abundância relativa (%).

Compostos: fração 39-49	T.R. (min.)	Percentagem (%)
6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona	36,346	4,021
δ -Undecalactona	52,574	2,425
γ -Tocoferol	62,076	0,816
Acetato de aplisterilo	62,727	6,309
β -Dihidrofucosterol	67,438	20,389
Estigmasta-3,5-dien-7-ona (Tremulona)	69,747	4,742
Moretenol	74,584	1,057
Total NI		48,035
Total Identificados		39,759

Nas frações analisadas pode constatar-se que os compostos identificados são maioritariamente terpenoides, pertencentes sobretudo à classe dos triterpenos. Para além destes, em quantidades muito inferiores, foram também detetados ácidos gordos. Assim os compostos maioritários foram o β -dihidrofucosterol, a α -amirina, a olean-12-en-11-ona e o hexadecanoato de metilo (palmitato de metilo).

Na fração 16-21 (tabela 17), os ácidos gordos detetados encontram-se esterificados com um grupo metilo, uma vez que esta fração foi sujeita a metilação com diazometano. Assim, provavelmente, os ésteres metílicos presentes nos compostos desta fração podem dever-se a esta reação, o que indica que estes compostos, no extrato, se devem encontrar na forma de ácido livre.

3.2.3. Saponificação

O processo de saponificação tem por base a hidrólise alcalina dos lípidos e a neutralização dos ácidos livres presentes na amostra. Assim, as fases B1 e B2 foram submetidas a uma saponificação, após a qual foram extraídas com diclorometano. Para ambas as fases, a fase orgânica recolhida foi a fração neutra devido aos compostos retirados. As fases aquosas foram acidificadas com HCl e, posteriormente, procedeu-se à sua extração para se retirar os compostos ácidos. Na fase B2, para além das frações neutra e ácida, foi recolhido um depósito sólido após a filtração das fases orgânicas e da fase aquosa. Estes depósitos são as ceras que se encontravam no extrato. Na tabela 20, encontram-se registadas as frações obtidas, no tratamento das fases B1 e B2, e as respetivas massas.

Tabela 20 Frações obtidas após tratamento da fase B1 e B2 e respetivas massas. A massa total recolhida de cada fase também foi registada.

	B1	B2
Fração neutra	0,151 g	0,525 g
Fração ácida	0,225 g	0,692 g
Depósito B2.1.	—	0,464 g
Depósito B2.2.	—	0,552 g
Depósito fase aq. B2	—	1,062 g
Massa total	0,376 g	3,295 g

As frações neutras de B1 e B2 foram analisadas por IV, como controlo de identificação dos grupos funcionais presentes. Esta análise foi realizada de forma a perceber-se a necessidade ou não de derivatizar a amostra, para posterior análise por GC-MS.

A Tabela 21 regista os compostos detetados por GC-MS das frações neutras de B1 e B2, a sua abundância relativa e os tempos de retenção. Para além disso, também são indicadas as percentagens totais de compostos identificados e de compostos não identificados, para cada uma das frações neutras.

Tabela 21 Comparação da composição química, abundância relativa e tempos de retenção das componentes das frações neutra B1 e neutra B2.

Composto	Neutra B1	Neutra B2
	T.R. (min.) Percentagem (%)	T.R. (min.) Percentagem (%)
6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona	36,258 1,325 %	36,287 1,306 %
Hexadecanoato de metilo	—	38,319 0,674 %
3,7,11,15-Tetrametilhexadec-2-en-1-ol (Fitol)	—	43,171 1,081

Pentacosano	55,382 2,119 %	55,380 0,956 %
Docosanoato de metilo	—	55,680 t
Hexacosano	—	56,682 0,386 %
Heptacosano	57,774 14,346 %	57,779 6,211 %
Tetracosanoato de metilo	—	58,090 t
Heptacosan-1-ol	58,725 1,914 %	—
Octacosano	58,759 2,101	58,759 1,045 %
Nonacosano	59,892 25,450 %	59,916 13,797
3 β -Acetoxiestigmasta-5,22-dieno (Acetato de estigmasterol)	—	61,660 t
γ -Tocoferol	—	62,086 1,750 %
Tetratriacontano	—	62,656 2,213 %
α -Tocoferol (Vitamina E)	—	63,380 t
β -Dihidrofucosterol	67,337 21,455 %	67,492 27,960 %
β -Amirina	—	68,142 2,875 %
α -Amirina	69,326 20,200 %	69,454 19,832 %
Estigmasta-3,5-dien-7-ona (Tremulona)	69,806 3,830 %	69,855 4,851 %
Estigmast-4-en-3-ona (Sitostenone)	—	71,060 3,182 %
Friedelan-3-ona (Friedelina)	—	73,456 1,631 %
Moretenol	—	76,621 1,192 %
Total NI	4,294	9,058
Total Identificados	92,740	90,942

Em ambas as frações, os compostos identificados são majoritariamente hidrocarbonetos, ácidos gordos e esteróis. Em menor quantidade foram detetadas outras classes de terpenoides. Assim, os compostos maioritários foram o nonacosano, o β -dihidrofucosterol e a α -amirina.

3.2.4. Metilação das frações ácidas

A frações ácidas de B1 e B2 recolhidas no processo de saponificação foram sujeitas a uma reação de derivatização, por adição de uma solução de diazometano em éter dietílico. Esta reação tinha o propósito de metilar os ácidos carboxílicos livres presentes nos compostos de cada

fração, originando ésteres metílicos. Posteriormente, as amostras foram analisadas no GC-MS para se proceder à identificação dos compostos presentes.

A tabela 22 registra os compostos detectados por GC-MS, a sua abundância relativa e os tempos de retenção. Para além disso também são indicadas as percentagens totais de compostos identificados e de compostos não identificados, para cada uma das frações ácidas.

Tabela 22 Comparação da composição química, abundância relativa e tempos de retenção das componentes das frações ácida B1 e ácida B2.

Composto	Ácida B1	Ácida B2
	T.R. (min.) Percentagem (%)	T.R. (min.) Percentagem (%)
Octanodioato de dimetilo	—	25,340 t
Dodecanoato de metilo	27,576 2,605 %	27,457 3,499 %
Nonanodioato de dimetilo	28,444 6,917 %	28,246 8,010 %
Tetradecanoato de metilo (Miristato de metilo)	33,189 4,486 %	33,129 4,292 %
Pentadecanoato de metilo	35,620 t	35,773 0,574 %
6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona	—	36,320 t
Hexadecanoato de metilo (Palmitato de metilo)	38,257 21,062 %	38,272 16,582 %
14-Metilhexadecanoato de metilo	40,630 t	—
15-Metilhexadecanoato de metilo	—	40,678 0,563 %
Octadeca-8,12-dienoato de metilo	—	42,523 0,952 %
Octadec-9-enoato de metilo	42,747 1,492 %	42,708 1,663 %
Octadecanoato de metilo (Estearato de metilo)	43,592 4,048 %	43,565 3,297 %
Docosan-1-ol	45,949 1,607 %	—
Icos-11-enoato de metilo	—	50,850 t
Icosanoato de metilo	51,921 1,411 %	51,900 1,399 %
Henicosanoato de metilo	—	54,280 t
Docosanoato de metilo	55,796 3,81 %	55,790 2,509 %
Hexacosano	—	56,650 0,296 %
Tricosanoato de metilo	57,033 1,208 %	57,023 0,852 %
Heptacosano	57,737 5,129 %	57,742 4,523 %
Tetracosanoato de metilo	58,067 4,058 %	58,063 2,474 %

Pentacosanoato de metilo	59,100 t	59,089 0,504 %
Nonacosano	59,835 16,215 %	59,868 12,327 %
Hexacosanoato de metilo	—	60,249 0,949 %
Triacotano	—	61,088 0,281 %
3 β -Acetoxiestigmasta-5,22-dieno (Acetato de estigmasterol)	61,814 1,029 %	
Hentriacotano	62,593 1,388 %	62,595 2,462 %
Acetato de aplisterilo	62,712 3,532 %	
Octacosanoato de metilo	63,212 3,420 %	63,210 2,188 %
Nonacosanoato de metilo		65,155 0,647 %
β -Dihidrofucosterol		67,252 2,244 %
Triacotanoato de metilo	67,548 8,842 %	67,594 9,659 %
Dotriacotanoato de metilo	74,150 t	74,147 3,316 %
Total NI	6,299	13,906
Total Identificados	92,260	86,062

Ambas as frações ácidas, contêm uma elevada quantidade de hidrocarbonetos, sendo que alguns destes são ácidos gordos esterificados com um grupo metilo. Assim, os compostos maioritários foram o nonacosano, o hexadecanoato de metilo e o triacotanoato de metilo. Para além de lípidos, em menor quantidade, foram detetados terpenoides.

3.3. Atividade biológica

O interesse nos produtos naturais como novos potenciais agentes antioxidantes têm vindo a aumentar. O principal objetivo passa pela substituição dos antioxidantes sintéticos, que se encontram presentes em alimentos e preparações farmacêuticas, por antioxidantes naturais.³⁹

Nas plantas, grande parte dos antioxidantes isolados são compostos fenólicos. Atendendo a este facto e aos resultados obtidos anteriormente, é pertinente e importante avaliar a atividade antioxidante do extrato etanol/água (80/20). A utilização de dois métodos permite avaliar a capacidade antioxidante do extrato por dois mecanismos diferentes, que determinam propriedades distintas. Os dois métodos aplicados foram o método do DPPH e o sistema β -caroteno/ácido linoleico.

3.3.1. Atividade antioxidante - Método do DPPH

Na determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH, após a medição das absorvâncias, é necessário calcular a % I, para posteriormente se calcular a IC₅₀. Para obter este parâmetro é necessário representar graficamente a % I em função da concentração de amostra na célula do espectrofotômetro, para cada uma das concentrações de DPPH utilizadas (Figura 20 à Figura 22). Nas tabelas 23 a 25 encontram-se os resultados para os parâmetros IC₅₀ e AAI, enquanto que na Tabela 26 está representado o resumo destes parâmetros, tanto para o extrato em estudo como para os padrões antioxidantes utilizados (rutina, trolox e ácido gálico).

Os cálculos dos parâmetros da atividade antioxidante apresentados para o extrato etanol/água servem de exemplo para o que foi calculado para padrões antioxidantes. As determinações destes encontram-se no Anexo II.

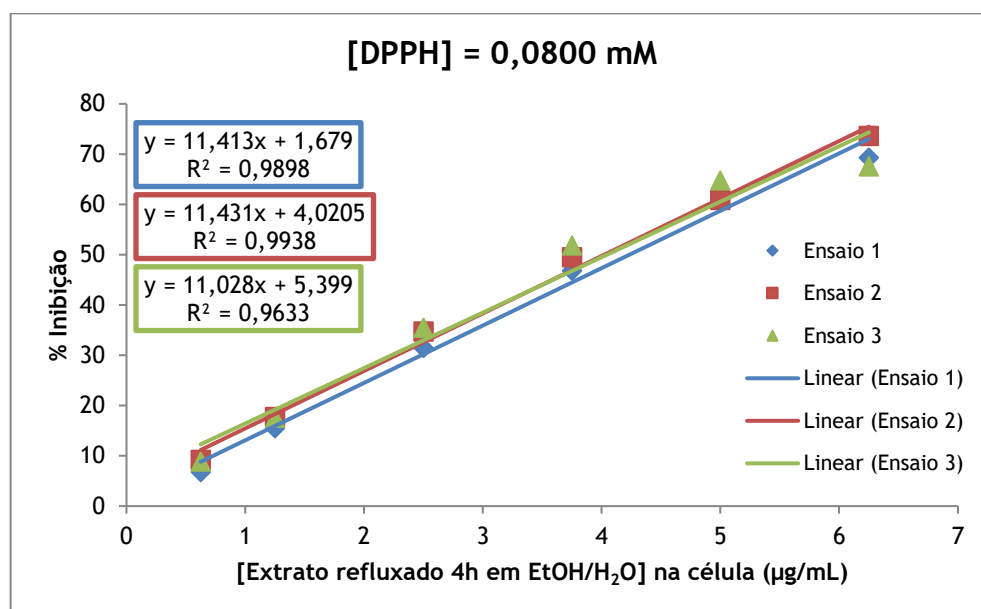


Figura 20 Representação gráfica da % I em função da concentração do extrato de etanol/água na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.

Tabela 23 Parâmetros IC₅₀ e AAI do extrato etanol/água, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média ± Desvio Padrão
IC ₅₀ (µg/mL)	4,2	4,0	4,0	4,1 ± 0,1
AAI	6,6	7,1	7,1	7,0 ± 0,3

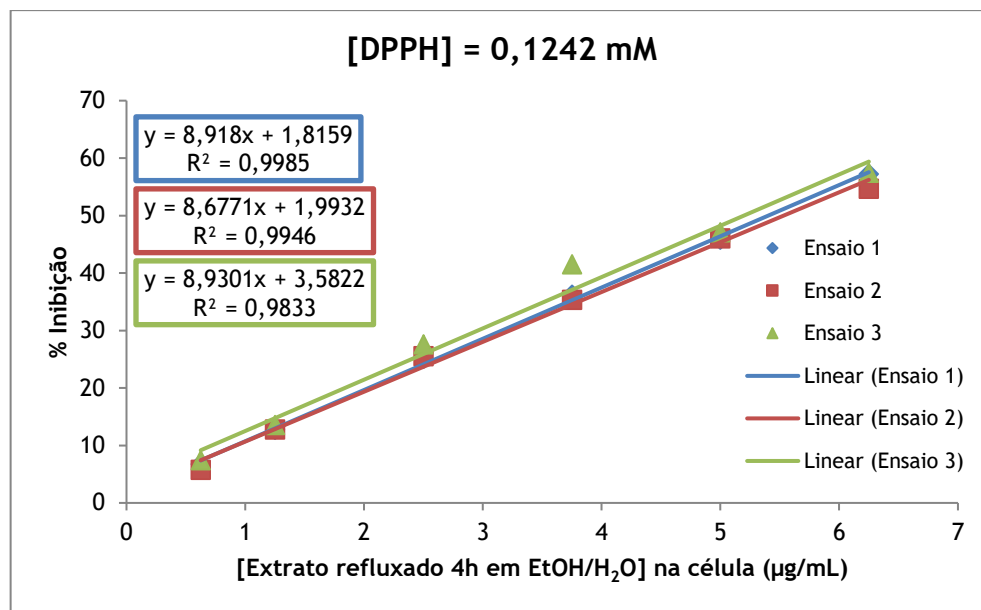


Figura 21 Representação gráfica da % I em função da concentração do extrato de etanol/água na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,1242 mM.

Tabela 24 Parâmetros IC_{50} e AAI do extrato etanol/água, para a concentração de DPPH de 0,1242 mM.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média ± Desvio Padrão
IC_{50} (µg/mL)	5,4	5,5	5,2	5,4 ± 0,2
AAI	8,4	8,2	8,8	8,5 ± 0,3

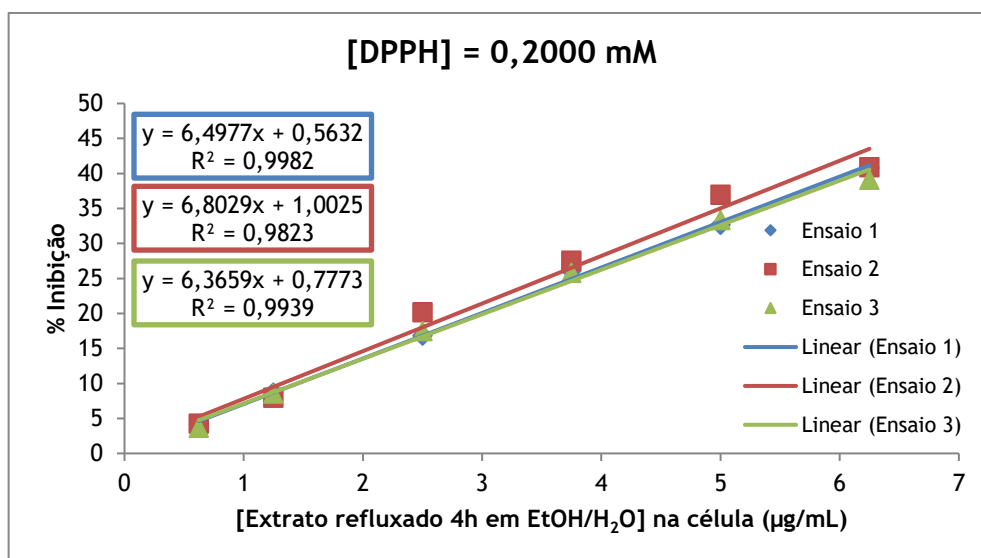


Figura 22 Representação gráfica da % I em função da concentração do extrato de etanol/água na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,2000 mM.

Tabela 25 Parâmetros IC₅₀ e AAI do extrato etanol/água, para a concentração de DPPH de 0,2000 mM.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média ± Desvio Padrão
IC ₅₀ (µg/mL)	5,4	5,5	5,2	5,4 ± 0,2
AAI	8,4	8,2	8,8	8,5 ± 0,3

Tabela 26 Resumo dos parâmetros IC₅₀ e AAI (média ± desvio médio) e classificação da atividade antioxidante para o extrato etanol/água para padrões rutina, trolox e ácido gálico.

	IC ₅₀ (µg/mL)	AAI	Atividade antioxidante
Extrato	5,7 ± 1,2	8,4 ± 1,0	Muito Forte
Rutina	8,1 ± 2,1	6,0 ± 0,4	Muito Forte
Trolox	7,8 ± 2,4	6,3 ± 0,2	Muito Forte
Ácido gálico	2,0 ± 0,6	23,9 ± 1,4	Muito Forte

Para promover 50% de inibição determinou-se que era necessário uma concentração de 5,7 µg/mL de extrato de etanol/água. Este extrato apresenta uma capacidade antioxidante muito forte, segundo o AAI. A IC₅₀ do extrato é inferior à de dois dos padrões, rutina e trolox, mas superior à do padrão ácido gálico, o que significa que o extrato tem maior poder antioxidante do que a rutina e o trolox, mas menor do que o ácido gálico.

Os parâmetros obtidos para os padrões vão de encontro aos que foram descritos por Scherer e colaboradores²⁹ e Luís e colaboradores⁴⁴, o que indica que o método é reprodutível e eficaz.

3.3.2. Atividade antioxidante - Sistema β-caroteno/ácido linoleico

No sistema β-caroteno/ácido linoleico, o radical peróxido formado na oxidação do ácido linoleico vai atacar as moléculas altamente insaturadas do β-caroteno, o que leva à sua descoloração. Este processo é semelhante ao que acontece a nível das membranas celulares, no organismo humano, onde a oxidação dos ácidos gordos que se encontram na sua constituição forma radicais livres lipídicos, o que desencadeia a destruição da membrana.^{31,32}

Na determinação da atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico, as % I ditam a atividade antioxidante do extrato. A % I do extrato é comparada à do padrão utilizado, o BHT (Figura 23). Os resultados obtidos para o extrato estudado demonstram que este possui menor atividade antioxidante que o BHT, não conseguindo atingir os 50% de inibição para as concentrações estudadas.

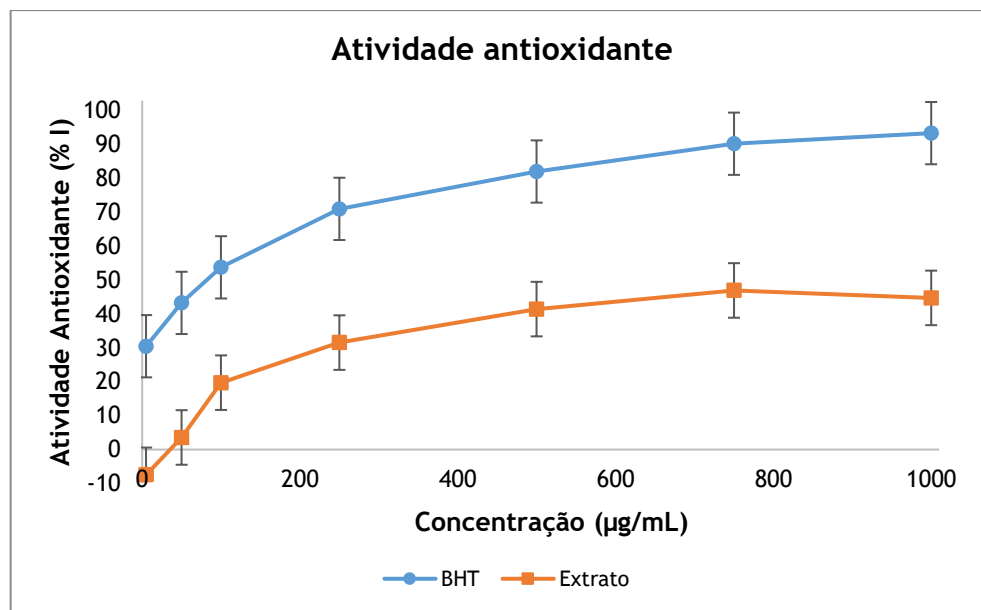


Figura 23 Atividade antioxidante do extrato e do padrão BHT, determinada pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico. Os resultados foram obtidos a partir da média das leituras das absorvâncias em duplicado.

4. Conclusões e Perspetivas futuras

Com este trabalho pretendia-se fracionar e caracterizar quimicamente os extratos obtidos por refluxo com *n*-hexano e com etanol/água (80/20), provenientes de cascas de *Salix salviifolia* subsp. *salviifolia*. Posteriormente, foi avaliada a sua atividade biológica, por determinação da atividade antioxidante dos extratos brutos. O estudo destes extratos seguiu abordagens bastante distintas. Atendendo ao facto, de aparentemente, não existirem estudos sobre esta planta, este trabalho assume especial relevância.

O extrato de *n*-hexano começou por sofrer um processo de separação dos seus constituintes, onde se obtiveram três fases que foram trabalhadas individualmente. A fase superior foi fracionada e algumas das frações obtidas foram por GC-MS, identificando-se, maioritariamente, compostos terpenoides, particularmente da classe dos triterpenos. De forma minoritária, foram detetados ácidos gordos. As duas fases restantes foram saponificadas e a sua análise por GC-MS, identificou nas frações neutras diversos hidrocarbonetos, ácidos gordos e terpenoides, enquanto que nas frações ácidas foram identificados hidrocarbonetos, principalmente ácidos gordos esterificados com um grupo metilo.

A atividade biológica não foi avaliada para o extrato de *n*-hexano, uma vez que o método não era adequado, devido ao solvente utilizado na preparação das soluções. Assim sendo, a procura de uma metodologia que possa determinar a atividade antioxidante do extrato de *n*-hexano, de forma eficiente, pode ser pertinente. Para além disso, seria necessário continuar as análises por GC-MS das frações que resultaram da coluna da fase superior.

Para o extrato de etanol água (80/20) foi realizada a determinação dos fenóis totais e dos flavonoides totais, concluindo-se que este possui um conteúdo fenólico elevado, mas um teor de flavonoides relativamente baixo. O fracionamento do extrato bruto demonstrou-se ineficaz e inconclusivo, uma vez que não foram obtidos produtos isolados, mas sim misturas destes. Numa tentativa de identificar os seus constituintes realizou-se a derivatização do extrato por metilação com diazometano e analisou-se por GC-MS. Esta técnica acabou por se mostrar ineficiente, dado que após a metilação não foi possível a dissolução total do extrato metilado em diclorometano, tornando os resultados pouco fiáveis.

Outra abordagem adotada foi a acetilação do extrato bruto, com o intuito proteger os grupos hidroxilo livres proporcionando a separação dos componentes do extrato. Inicialmente, a reação de acetilação foi efetuada sem catalisador, o que mostrou ser ineficiente. Posteriormente, realizou-se outra acetilação, mas com a presença de um catalisador DMAP para aumentar a eficácia da reação. Os produtos resultantes desta reação foram analisados por GC-MS, o que resultou na identificação dos seus constituintes, sendo estes maioritariamente monossacáridos e dissacáridos acetilados e também alguns glicósidos. Em quantidades menores

foram detetadas lactonas, esteroides e furanocumarinas. A nível de compostos da família dos salicilatos foi detetada a salicoilsalicina.

Em algumas frações obtidas no fracionamento da Acetilação II foram identificação estruturalmente, por RMN, 3 compostos: 3-Acetil-3-hidroxi-6-metil-piran-2,4-diona, 3-Acetil-3,6-dimetil-piran-2,4-diona e o Ácido (*E*)-2-acetil-3-hidroxibut-2-enóico.

Apesar de algumas frações resultantes da CC das Acetilações I e II terem sido analisadas por RMN e de terem sido identificados 3 compostos, é necessário continuar este estudo através, por exemplo, da realização de GC-MS nas frações em que se justifica.

A atividade biológica foi avaliada por determinação da atividade antioxidante para o extrato de etanol/água (80/20), por dois métodos diferentes. Pelo método do DPPH, o extrato demonstrou um elevado poder antioxidante, uma vez que a concentração necessária para promover 50 % de inibição obtida foi 5,7 µg/mL, a qual é inferior ao IC₅₀ dos padrões rutina e trolox mas superior à do ácido gálico. Pelo AAI, o extrato foi classificado como muito forte, quanto à sua atividade antioxidante. No sistema β -caroteno/ácido linoleico, o extrato demonstrou uma atividade antioxidante menor do que o padrão BHT, não se conseguindo atingir uma % I superior a 50%, nas concentrações estudadas.

A atividade antioxidante das frações obtidas, ao longo deste estudo, não foi determinada. Assim, seria pertinente avaliá-la, sobretudo no que diz respeito às frações do extrato de etanol/água, uma vez que era importante perceber-se quais os compostos responsáveis pelo poder antioxidante.

Atendendo ao facto, de não existirem estudos sobre esta planta será importante a continuação da sua investigação. Assim, poderiam ser avaliadas outras atividades biológicas, bem como, a realização de testes *in vitro* com os compostos isolados.

Referências

- (1) Proença da Cunha, A. *Farmacognosia E Fitoquímica*, 3º ed.; Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 2010.
- (2) Fabricant, D. S.; Farnsworth, N. R. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environ. Health Perspect.* 2001, 109 (SUPPL. 1), 69-75.
- (3) *Flora Iberica: Plantas Vasculares de La Península Ibérica E Islas Baleares Vol. III*, 2nd ed.; Castroviejo, S., Aedo, C., Cirujano, S., Laínz, M., Montserrat, P., Morales, R., Garmendia, F. M., Navarro, C., Paiva, J., Soriano, C., Eds.; Real Jardín Botánico, CSIC: Madrid, 2006.
- (4) Malterud, K. E.; Bremnes, T. E.; Faegri, A.; Moe, T.; Sandanger Dugstad, E. K.; Anthonsen, T.; Henriksen, L. M. Flavonoids from the Wood of *Salix Caprea* as Inhibitors of Wood-Destroying Fungi. *J. Nat. Prod.* 1985, 48 (4), 559-563.
- (5) Alam, M. S.; Kaur, G.; Jabbar, Z.; Javed, K.; Athar, M. Evaluation of Antioxidant Activity of *Salix Caprea* Flowers. *Phyther. Res.* 2006, 20, 479-483.
- (6) Ahmed, A.; Shah, W. A.; Akbar, S.; Younis, M.; Kumar, D. A Short Chemical Review on *Salix Caprea* Commonly Known as Goat Willow. *Int. J. Res. Phytochem. Pharmacol.* 2011, 1 (1), 17-20.
- (7) Ahmed, A.; Akbar, S.; Muzafar, S.; Shah, W. A. Antidiabetic and Antioxidant Potential of Methanol Extract of *Salix Caprea* Inflorescence. *Adv. Biomed. Pharm.* 2015, 2 (3), 159-162.
- (8) Pohjamo, S. P.; Hemming, J. E.; Willför, S. M.; Reunanen, M. H. T.; Holmbom, B. R. Phenolic Extractives in *Salix Caprea* Wood and Knots. *Phytochemistry* 2003, 63 (2), 165-169.
- (9) Enayat, S.; Banerjee, S. Comparative Antioxidant Activity of Extracts from Leaves, Bark and Catkins of *Salix Aegyptiaca* Sp. *Food Chem.* 2009, 116, 23-28.
- (10) Hussain, H.; Badawy, A.; Elshazly, A.; Elsayed, A.; Krohn, K.; Riaz, M.; Schulz, B. Chemical Constituents and Antimicrobial Activity of *Salix Subserata*. *Rec. Nat. Prod.* 2011, 5 (2), 133-137.
- (11) Kim, C. S.; Subedi, L.; Park, K. J.; Kim, S. Y.; Choi, S. U.; Kim, K. H.; Lee, K. R. Salicin Derivatives from *Salix Glandulosa* and Their Biological Activities. *Fitoterapia* 2015, 106, 147-152.
- (12) Kammerer, B.; Kahlich, R.; Biegert, C.; Gleiter, C. H.; Heide, L. HPLC-MS/MS Analysis of Willow Bark Extracts Contained in Pharmaceutical Preparations. *Phytochem. Anal.* 2005, 16, 470-478.
- (13) Flora-On: Flora de Portugal Interactiva - Sociedade Portuguesa de Botânica. *Salix salviifolia*

- subsp. salviifolia <http://flora-on.pt/#/0Jz0d> (consultado em 30 de agosto de 2017).
- (14) Lourenço, J.; Araújo, P. V.; Pereira, E. P.; Caraça, R.; Aguiar, C.; Carapeto, A.; Almeida, J. D.; Henriques, T. M. *Salix salviifolia* Brot. subsp. *salviifolia* - mapa de distribuição www.flora-on.pt/#wSalix+salviifolia+subsp.+salviifolia (consultado em 30 de agosto de 2017).
 - (15) *Natural Products of Woody Plants I*; Rowe, J. W., Ed.; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989.
 - (16) Harborne, J. B. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*; Springer Netherlands, 1998; Vol. 3.
 - (17) *Natural Products from Plants*, 2nd ed.; Cseke, L., Kirakosyan, A., Kaufman, P., Warber, S., Duke, J., Brielmann, H., Eds.; CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006; Vol. 62.
 - (18) Sousa, C. M. de M.; Silva, H. R. e; Vieira-Jr., G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S. da; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. de M.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H. Fenóis Totais E Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. *Quim. Nova* 2007, 30 (2), 351-355.
 - (19) Miguel, M. G. Antioxidant Activity of Medicinal and Aromatic Plants. A Review. *Flavour Fragr. J.* 2010, 25, 291-312.
 - (20) Xu, D. P.; Li, Y.; Meng, X.; Zhou, T.; Zhou, Y.; Zheng, J.; Zhang, J.-J.; Li, H.-B. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18 (96).
 - (21) Peixoto Sobrinho, T. J. S.; Gomes, T. L. B.; Cardoso, K. C. M.; Albuquerque, U. P.; Amorim, E. L. C. Teor de Flavonóides Totais Em Produtos Contendo Pata-de-Vaca (*Bauhinia* L.) Comercializados Em Farmácias de Recife/PE. *Rev. Bras. Plantas Med.* 2012, 14 (4), 586-591.
 - (22) Katyal, M. Flavones as Analytical Reagents - a Review. *Talanta* 1968, 15, 95-106.
 - (23) Haminiuk, C. W. I.; Maciel, G. M.; Plata-Oviedo, M. S. V.; Peralta, R. M. Phenolic Compounds in Fruits - an Overview. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2012, 47 (10), 2023-2044.
 - (24) *Handbook of Reagents for Organic Synthesis, Activating Agents and Protecting Groups*; Pearson, A. J., Roush, W. R., Eds.; John Wiley & Sons, 1999; Vol. 2007.
 - (25) Llica, E. R.; Castañeda, B.; Vásquez, L. Evaluación de La Capacidad Antioxidante de Plantas Medicinales Peruanas Nativas E Introducidas. *Rev. Acad. Peru Salud* 2008, 15 (1), 42-46.
 - (26) Pisoschi, A. M.; Pop, A. The Role of Antioxidants in the Chemistry of Oxidative Stress: A Review. *Eur. J. Med. Chem.* 2015, 97, 55-74.

- (27) Alves, C. Q.; David, J. M.; David, J. P.; Bahia, M. V.; Aguiar, R. M. Métodos Para Determinação de Atividade Antioxidante in Vitro Em Substratos Orgânicos. *Quim. Nova* 2010, 33 (10), 2202-2210.
- (28) Çam, M.; Hişil, Y.; Durmaz, G. Classification of Eight Pomegranate Juices Based on Antioxidant Capacity Measured by Four Methods. *Food Chem.* 2009, 112 (3), 721-726.
- (29) Scherer, R.; Godoy, H. T. Antioxidant Activity Index (AAI) by the 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Method. *Food Chem.* 2009, 112 (3), 654-658.
- (30) Amorati, R.; Foti, M. C.; Valgimigli, L. Antioxidant Activity of Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61 (46), 10835-10847.
- (31) Alencar, D. B.; Carvalho, F. C. T.; Rebouças, R. H.; Santos, D. R.; Pires-Cavalcante, K. M. dos S.; Lima, R. L.; Baracho, B. M.; Bezerra, R. M.; Viana, F. A.; Vieira, R. H. S. dos F.; Sampaio, A. H.; Sousa, O. V.; Saker-Sampaio, S. Bioactive Extracts of Red Seaweeds *Pterocladia* Capillacea and *Osmundaria Obtusiloba* (Floridophyceae: Rhodophyta) with Antioxidant and Bacterial Agglutination Potential. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2016, 9 (4), 372-379.
- (32) Ju, Y.; Zhang, A.; Fang, Y.; Liu, M.; Zhao, X.; Wang, H.; Zhang, Z. Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Grape Canes Extracts from Vineyards. *Spanish J. Agric. Res.* 2016, 14 (3).
- (33) Sarikurkcu, C.; Arisoy, K.; Tepe, B.; Cakir, A.; Abali, G.; Mete, E. Studies on the Antioxidant Activity of Essential Oil and Different Solvent Extracts of *Vitex Agnus Castus* L. Fruits from Turkey. *Food Chem. Toxicol.* 2009, 47 (10), 2479-2483.
- (34) Silva, F. A. M.; Borges, M. F. M.; Ferreira, M. A. Métodos Para Avaliação Do Grau de Oxidação Lipídica E Da Capacidade Antioxidante. *Quim. Nova* 1999, 22 (1), 94-103.
- (35) Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L. *Purification of Laboratory Chemicals*, 7th ed.; Butterworth-Heinemann, 2013.
- (36) Martins, N. V. D. F. Bioprospecção de Plantas: Obtenção de Extratos de Cascas de *Salix Salviifolia*. Projeto apresentado à Universidade da Beira Interior para obtenção do grau de Licenciada em Química Medicinal, 2014.
- (37) Luís, Â. Avaliação das actividades antioxidante e anti-Microbiana de extractos de resíduos florestais. Dissertação apresentada à Universidade da Beira Interior para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, 2009.
- (38) Miliauskas, G.; Venskutonis, P. R.; Van Beek, T. A. Screening of Radical Scavenging Activity of Some Medicinal and Aromatic Plant Extracts. *Food Chem.* 2004, 85 (2), 231-237.
- (39) Tawaha, K.; Alali, F. Q.; Gharaibeh, M.; Mohammad, M.; El-Elmat, T. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Selected Jordanian Plant Species. *Food Chem.* 2007, 104

- (4), 1372-1378.
- (40) Pourmorad, F.; Hosseinimehr, S. J.; Shahabimajd, N. Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of Some Selected Iranian Medicinal Plants. *African J. Biotechnol.* 2006, 5 (11), 1142-1145.
- (41) Reis, M. J. A. A Glicosilação de Esteroides Na Preparação de Compostos Potencialmente Bioativos. Projeto apresentado à Universidade da Beira Interior para obtenção do grau de Licenciada em Química Medicinal, 2016.
- (42) Broinizi, P. R. B.; Andrade-Wartha, E. R. S.; Silva, A. M. D. O.; Novoa, A. J. V.; Torres, R. P.; Azeredo, H. M. C.; Alves, R. E.; Mancini-Filho, J. Avaliação Da Atividade Antioxidante Dos Compostos Fenólicos Naturalmente Presentes Em Subprodutos Do Pseudofruto de Caju (*Anacardium Occidentale* L.). *Ciência e Tecnol. Aliment.* 2007, 27 (4), 902-908.
- (43) Marco, G. J. A Rapid Method for Evaluation of Antioxidants. *J. Am. oil Chem. Soc.* 1968, 45 (9), 594-598.
- (44) Luís, Â.; Gil, N.; Amaral, M. E.; Domingues, F.; Duarte, A. P. *Ailanthus Altissima* (Miller) Swingle: A Source of Bioactive Compounds with Antioxidant Activity. *BioResources* 2012, 7 (2), 2105-2120.

Comunicações e Publicações

Comunicação em painel no âmbito desta dissertação, no V Ciclo de Conferências da Faculdade de Ciências, 2017

Caraterização fitoquímica do extrato etanólico da casca de *Salix salviifolia*

M. Lucas¹, J.A. Figueiredo¹, A.P. Duarte², M.I. Ismael¹

¹Departamento de Química, Materiais Fibrosos e Tecnologias Ambientais, FibEnTech, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

²CICS-UBI - Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

E-mails: mariana.lucas@ubi.pt; iismael@ubi.pt

A utilização de produtos naturais para fins medicinais remonta ao aparecimento das primeiras civilizações. Atualmente, utiliza-se os compostos extraídos das plantas, responsáveis pela ação farmacológica, e não os extratos completos destas, para a terapêutica. Assim, para se conhecer os componentes estruturais com interesse medicinal efetua-se uma bateria de testes, de forma a concluir o que realmente leva a essa atividade e a sua extensão.

Neste trabalho estuda-se o extrato obtido por refluxo com etanol/água (80:20) de cascas de *Salix salviifolia*, também conhecido como Salgueiro-branco. Este estudo tem como objetivo a avaliação da atividade antioxidante, o fracionamento e a caraterização química do extrato, com a finalidade de isolar os componentes maioritários que serão submetidos à avaliação da atividade biológica *in vitro*.

Para determinação da atividade antioxidante recorreu-se ao método do DPPH. Na caraterização química, para a determinação dos fenóis totais utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu e para determinação dos flavonoides totais foi utilizado um método colorimétrico usando o cloreto de alumínio.

Verificou-se que este extrato apresenta uma atividade antioxidante muito forte, de acordo com a classificação do Índice de Atividade Antioxidante (AAI). O conteúdo de fenóis totais quantificado foi 413,2 mg de equivalentes de ácido gálico/g matéria seca. Quanto à quantificação dos flavonoides totais foi obtido 6,4 mg de equivalentes de quercetina/g de matéria seca.

Palavras-chave: *Salix salviifolia*, atividade antioxidante, fenóis totais, flavonoides totais.

Comunicação oral no âmbito desta dissertação, no 2nd Symposium of FibEnTech-UBI: Fiber Materials and Environmental Technologies, 2017

Phytochemical characterization and determination of the biological activity of barks extracts of *Salix salviifolia*

M. Lucas¹, M. Gomes¹, J. A. Figueiredo¹, A. P. Duarte², M. I. Ismael¹

¹ FibEnTech, Department of Chemistry, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

² CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

Salix salviifolia subsp. *salviifolia* is a plant of the family Salicaceae, commonly known as White willow, Willow-leaves-of-saves, among other names [1]. This plant is widely distributed throughout the Iberian Peninsula and is preferably found in humid places [1]. Although there are several studies focusing on the *Salix* species and their medicinal properties, there are no studies on *Salix salviifolia*.

In this work the extract obtained by refluxing with ethanol/water (80:20) and with n-hexane, both of *Salix salviifolia* bark were studied [2]. This study aims to characterize the chemical and fractionation of the extract, with the purpose of determining its biological activity, by determining the antioxidant activity of both crude extracts and fractions obtained.

The determination of the antioxidant activity was based on the DPPH method [3,4]. In the chemical characterization of the ethanolic extract, for the determination of the total phenols the Folin-Ciocalteu method was used and for determination of total flavonoids a colorimetric method was used using aluminum chloride [3,4,5,6,7]. The antioxidant capacity of this extract was also evaluated by the β -carotene/linoleic acid system. The extracts were fractionated by column chromatography using silica gel and the phytochemical identification was obtained by gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS).

The ethanolic extract showed a very strong antioxidant activity, being rich in phenolic compounds. Both extracts have very different constituents, being present phenolic compounds, flavonoids, steroids, among others.

References

- [1] Flora-On: Flora de Portugal Interactiva - Sociedade Portuguesa de Botânica. *Salix salviifolia* subsp. *salviifolia* <http://flora-on.pt/#/0Jz0d> (accessed May 30, 2017).
- [2] Martins, Nelson V.D.F., Bioprospecção de plantas: Obtenção de extratos de cascas de *Salix salviifolia*, Project presented to the Universidade da Beira Interior to obtain the graduation in Medicinal Chemistry, 2014.
- [3] Luís, Â. F. S., Avaliação das actividades antioxidante e anti-microbiana de extractos de resíduos florestais, Master's thesis in Biochemistry, Universidade da Beira Interior, 2009.

- [4] Scherer, R.; Godoy, H., Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem.* 2009, 112 (3), 654-658.
- [5] Miliauskas, G.; Venskutonis, P. R.; Van Beek, T. A., Screening of Radical Scavenging Activity of Some Medicinal and Aromatic Plant Extracts. *Food Chem.* 2004, 85 (2), 231-237.
- [6] Tawaha, K.; Alali, F. Q.; Gharaibeh, M.; Mohammad, M.; El-Elmat, T., Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Selected Jordanian Plant Species. *Food Chem.* 2007, 104 (4), 1372-1378.
- [7] Pourmorad, F.; Hosseinimehr, S. J.; Shahabimajd, N., Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of Some Selected Iranian Medicinal Plants. *African J. Biotechnol.* 2006, 5 (June), 1142-1145.

**Artigo submetido, no âmbito desta dissertação, para publicação
em Livro de Atas do 2nd Symposium of FibEnTech-UBI: Fiber
Materials and Environmental Technologies, 2017**

**Phytochemical characterization and determination of biological activity of
barks extracts of *Salix salviifolia***

M. Lucas¹, M. Gomes¹, J. A. Figueiredo¹, A. P. Duarte², M. I. Ismael¹

¹ FibEnTech, Department of Chemistry, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

² CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

Abstract

In this work, the extracts of *Salix salviifolia* bark obtained by refluxing with ethanol/water (80/20) and with *n*-hexane, were studied of. This aim of this study was to characterize the chemical composition of those extracts, with the purpose of determining its biological activity, by evaluating the antioxidant activity of both extracts.

The determination of the antioxidant activity was made by the DPPH method. In the chemical characterization of the hydroethanolic extract, the Folin-Ciocalteu method was used for the total phenols quantification and for determination of total flavonoids, a colorimetric method was used using aluminum chloride. The antioxidant capacity of this extract was also evaluated by the β -carotene/linoleic acid system. The phytochemical identification was obtained by gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS).

The hydroethanolic extract showed a very strong antioxidant activity, being rich in phenolic compounds. Both extracts have different chemical constituents, being present phenolic compounds, flavonoids, steroids, among others.

Introduction

Nowadays, compounds extracted from the plants are used for pharmacological purposes and crude extracts show also pharmacology interest. Thus, in order to know the structural components of pharmacological interest, a battery of tests is usually performed, in order to conclude what actually leads to this activity and its extension. [1]

Salix salviifolia subsp. *Salviifolia* (Figure 1), commonly known as White Willow, among other denominations, is an endemic species of the Iberian Peninsula and in Continental Portugal it is widely distributed in the northern and central regions, being autochthonous in these places.

The trees of this species grow preferentially in humid places, choosing the conditions offered by the waterways as the ideal ones. [2,3]

Although there are several studies focusing on the *Salix* species and their medicinal properties, it is not of our knowledge the existence of studies on *Salix salviifolia*.



Figure 1 *Salix salviifolia* subsp. *Salviifolia* flowering. [2]

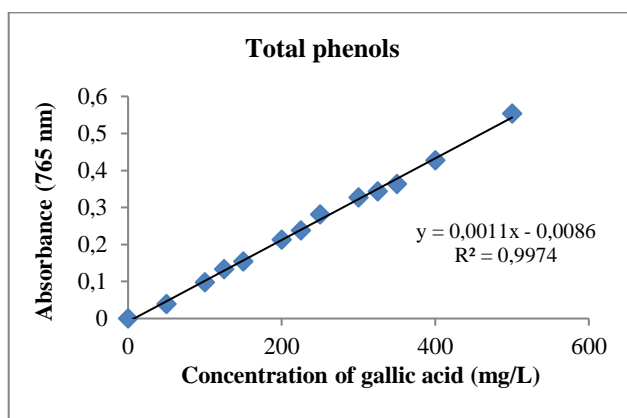
Experimental

The extracts were obtained from logs and branches harvested in the parish of Três Povos, near the village of Escarigo, Fundão (Coordinates: 40° 14'14.78"N / 7° 16'42.03"W). After collection, the barks were removed and dried at 30 °C for 15 days, and then milled. The samples were collected on January 2014. [4]

The extraction of the active compounds was carried out in two phases. First, the non-polar compounds were collected by extraction with *n*-hexane in hot soxhlet. The extract obtained was concentrated under vacuum to remove the solvent. After this extraction, the barks were submitted to another extraction process, in order to collect the polar compounds, under reflux with ethanol/water (80/20) in which the ratio of the sample to the solvent was 1/20. After extraction, the filtrates were vacuum-dried and the filtrates obtained were concentrated. [4]

The determination of total phenols was performed by the Folin-Ciocalteu colorimetric method. The calibration curve was prepared with different concentrations of methanolic solutions of gallic acid. Gallic acid was used as standard in the following concentrations: 50, 100, 125, 150, 200, 225, 250, 300, 325, 350, 400 and 500 mg/L. For this assay, 450 µL of distilled water was added to 50 µL of the above-mentioned solutions and then 2.5 mL of 0.2 N Folin-Ciocalteu reagent was added. After addition of gallic acid, distilled water and Folin-Ciocalteu reagent, 5 minutes were allowed to react at room temperature. Then, 2 mL of sodium carbonate (75 g/L aqueous solution) were added. This mixture was allowed to incubate, in a water bath at 30°C, it for 90 minutes, with intermittent stirring. The blank was prepared as described above, replacing the 50 µL of solution with 50 µL of methanol. The assay was performed in triplicate and after incubation, the absorbances were read at 765 nm. To determine the total phenol content in the extract, the initial 50 µL was replaced by 50 µL of a solution of the extract in methanol and proceeded as described above. To calculate the amount of total phenols present

in the extract, it was used the equation of the calibration curve of gallic acid in methanol (Graphic 1). [5-7]

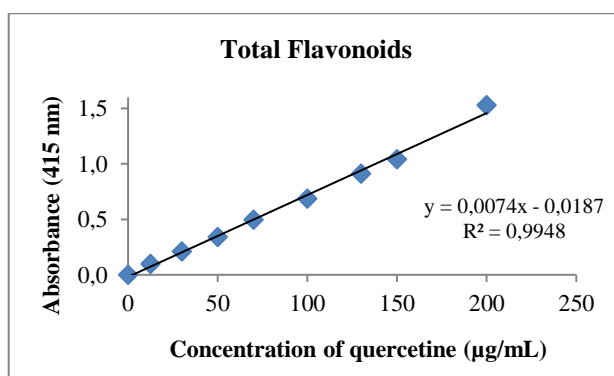


Graphic 1 Gallic acid calibration curve for determination of total phenols, obtained from the average of the absorbance of triplicate assays.

The determination of the total flavonoids was performed using the colorimetric method of aluminum chloride. The calibration curve was prepared with different concentrations of methanolic solutions of quercetin, the reference compound, with the following concentrations: 12.5, 30, 50, 70, 100, 230, 150 and 200 µg/mL. [5,8]

To 500 mL of the above solutions was added 1.5 mL of methanol, 0.1 mL of aqueous aluminum chloride solution (10%), 0.1 mL of 1M aqueous potassium acetate solution and finally 2.8 mL of distilled water. At room temperature, it was allowed to react for 30 minutes with intermittent stirring. The blank was prepared as described above, replacing the 500 µL of solution with 500 µL of methanol. The assay was performed in triplicate and after incubation time, the absorbance was read at 415 nm. For the determination of the total flavonoid content in the extract, the initial 500 µL was replaced by 500 µL of a solution of the extract in methanol and was carried out as described above. For the extract, the assay was performed in quintuplicate.

To calculate the amount of total flavonoids, present in the extract, the equation of the quercetin calibration curve in methanol was used (Graphic 2). [5,8]



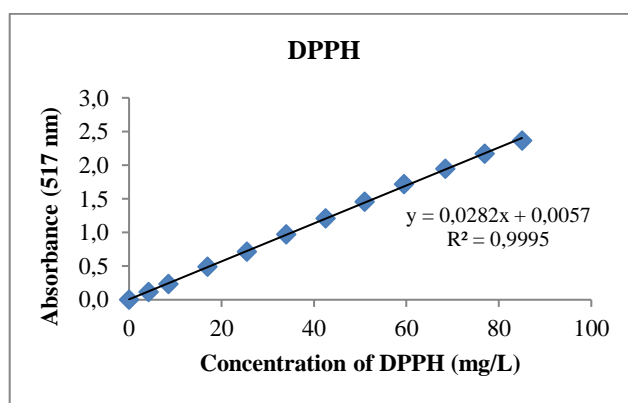
Graphic 2 Quercetin calibration curve for determination of total flavonoids, obtained from the average of the absorbance of triplicate assays.

To determine the antioxidant activity by the colorimetric method with DPPH, a calibration curve was constructed. A stock solution of DPPH in methanol was prepared with a concentration of 0.216 mM or 85 mg/L. From this solution, different dilutions were prepared with defined concentrations, which are listed in Table 1. [5]

Table1 Concentrations of the methanolic solutions of DPPH used in the construction of the calibration curve.

[DPPH] mM	[DPPH] mg/L
0.0108	4.25
0.0216	8.50
0.0432	17.00
0.0648	25.50
0.0864	34.00
0.1080	42.50
0.1296	51.00
0.1512	59.50
0.1739	68.43
0.1955	76.93
0.2160	85.00

After the preparation of those solutions, the absorbances were read at 517 nm against a blank consisting of methanol. Absorbance readings were done in triplicate. The calibration curve was constructed with the concentrations of DPPH, in mg/L, on the abscissa axis while the absorbances read were placed on the ordinate axis (Graphic 3). [5]



Graphic 3 DPPH calibration curve for determination of antioxidant activity, obtained from the average of the absorbance of triplicate assays.

For the determination of the antioxidant activity of the extract by this method, three solutions of DPPH in methanol, with concentration 0.2000, 0.1242 and 0.0800 mM, were prepared. All DPPH solutions used were prepared daily, allowed to stabilize and protected from light, due to the sensitivity of DPPH. As for the extract, dilutions of in methanol were prepared with concentrations of 25, 50, 100, 150, 200 and 250 µg/mL. [5,9]

For each prepared DPPH solution and for each concentration of the extract, the following experimental procedure was performed: 3.9 mL of DPPH solution was added to 0.1 mL of the sample. It was allowed to incubate in the dark at room temperature for 90 minutes and after the absorbances were read at 517 nm. For each DPPH solution, a control consisting of 0.1 mL of methanol and 3.9 mL of DPPH solution was prepared, which was subjected to the same conditions as the samples under study. Blank contained only methanol. The assays were performed in triplicate. [5,9]

Rutin, trolox and gallic acid were used as antioxidant positive controls. Methanolic solutions of these standards were prepared.

To determine the antioxidant activity by the β -carotene/linoleic acid method, it was necessary to prepare an emulsion daily. For this, 500 μ L of a solution of β -carotene in chloroform (20 mg/mL), 40 μ L of linoleic acid, 400 μ L of Tween 40 and 1 mL of chloroform were added to a round bottom flask. The mixture was homogenized and the chloroform was evaporated using the rotary evaporator at 45 °C for 5 minutes. After evaporation under vigorous and continuous stirring, 100 mL of distilled water saturated with oxygen was added to the above mixture. [5,10,11]

For the determination of the antioxidant activity of the extract, by this method, dilutions in methanol with concentrations of 5, 50, 100, 250, 500, 750 and 1000 μ g/mL, were prepared. For each concentration of the extract, the following experimental procedure was performed in a test tube: to 5 mL of the previously prepared emulsion was added 300 μ L of sample. For each sample a control was prepared, where 300 μ L of sample was replaced with methanol. An emulsion without β -carotene was used for the blank test. Thus, the white emulsion was prepared in the same manner as above, where only 500 μ L of β -carotene solution was replaced with 500 μ L of chloroform. [5,10]

The assay was performed in duplicate and the absorbances were read at 470 nm after one hour of reaction in a 50 °C bath. The absorbance of the control was read, at time zero and after one hour of reaction, against the blank. [5]

For positive control, butylated hydroxytoluene (BHT) was used as the standard. The experimental procedure used for the standard was the same as described for the sample. The antioxidant activity of the sample was compared with that of the BHT standard. [5]

Results and Discussion

The determination of the total phenolics, total flavonoids and the antioxidant activity by the two different methods was applied to the extract obtained by reflux of 4 hours with ethanol/water (80/20).

The result of the determination of total phenols is expressed in milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry-material (mg GAE/g dry-material), while the determination of total flavonoids is expressed in milligrams of quercetin equivalents per gram of dry-material (mg QE/g dry-material). (Table 2)

Table 2 Contents of total phenols and total flavonoids in hydroethanolic extract.

	Total phenols (average \pm standard deviation)	Total flavonoids (average \pm standard deviation)
Extract	413.2 \pm 4.8 mg GAE/g dry-material	6.4 \pm 1.6 mg QE/g dry-material

Concerning the antioxidant activity determined by the DPPH method, the inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated, that is, the antioxidant concentration required to reduce the initial concentration of DPPH by 50%. The results of the antioxidant activity are expressed according to the Antioxidant Activity Index (AAI). [5,9] The AAI was calculated with the following formula (Eq.1):

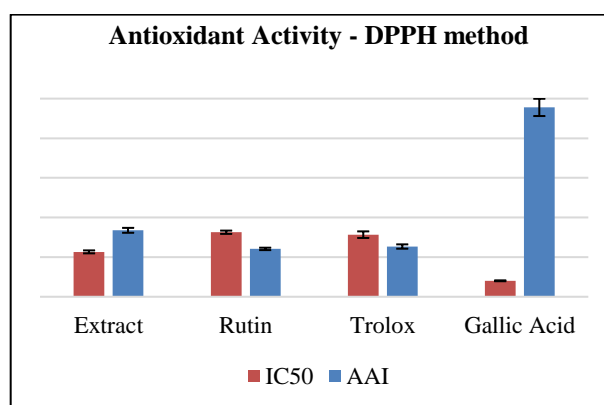
$$AAI = \frac{[DPPH \text{ in control at 90 minuts}] (\mu g/mL)}{IC_{50} (\mu g/mL)} \quad (1)$$

According to the AAI, the antioxidant activity of the compounds are classified as poor, moderate, strong and very strong. (Table 3) [5,9]

Table 3 Classification of a sample as to its antioxidant activity.

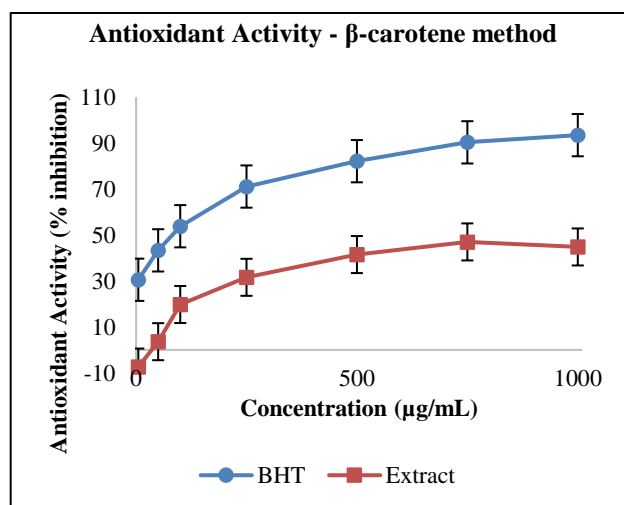
Antioxidant Activity	AAI
Poor	AAI < 0.5
Moderate	0.5 < AAI < 1.0
Strong	1.0 < AAI < 2.0
Very strong	AAI > 2.0

The obtained results were compared to three positives controls with different antioxidant capacity: rutin, trolox and gallic acid. (Graphic 4)



Graphic 4 Antioxidant activity for the hydroethanolic extract and for the three standards, obtained from the average of the absorbance of triplicate assays. The IC_{50} is presented in mg/L.

The hydroethanolic extract presents an IC_{50} of lower than two of the standards (rutin and trolox), thus showing greater antioxidant capacity than those. According to the AAI, the extract is classified as very strong.



Graphic 5 Antioxidant activity of hydroethanolic extract and BHT standard, obtained from the average of the absorbance of duplicate assays.

The antioxidant activity determined by the β -carotene/linoleic acid method demonstrates that at the lowest concentration the extract has no activity, but subsequently increases with increasing concentration. The antioxidant activity of the extract is lower than that of the BHT standard, indicating that it has less capacity to sequester the peroxide radical of linoleic acid. As for the extract of *n*-hexane, it was not possible to determine the antioxidant activity by these methods, since the extract was not completely soluble in methanol, it was necessary to find another characterization technique. So, a phytochemical identification by GC-MS was carried out, which is not yet finalized, but both extracts showed very different chemical constituents, being present flavonoids, other phenolic compounds, steroids, some of which in the form of glycosides.

Conclusions

According to the DPPH method, the hydroethanolic extract has a very strong antioxidant activity and high phenolic content, while the flavonoid content is relatively low. By the β -carotene/linoleic acid method, the hydroethanolic extract has lower antioxidant activity than the BHT standard. The hydroethanolic and *n*-hexane extracts are still studied in order to obtain the photochemical identification.

References

- [1] Proença da Cunha, A. *Farmacognosia E Fitoquímica*, 3rd ed.; Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 2010.
- [2] Flora-On: Flora de Portugal Interactiva - Sociedade Portuguesa de Botânica. *Salix salviifolia* subsp. *salviifolia* <http://flora-on.pt/#/0Jz0d> (accessed May 30, 2017).

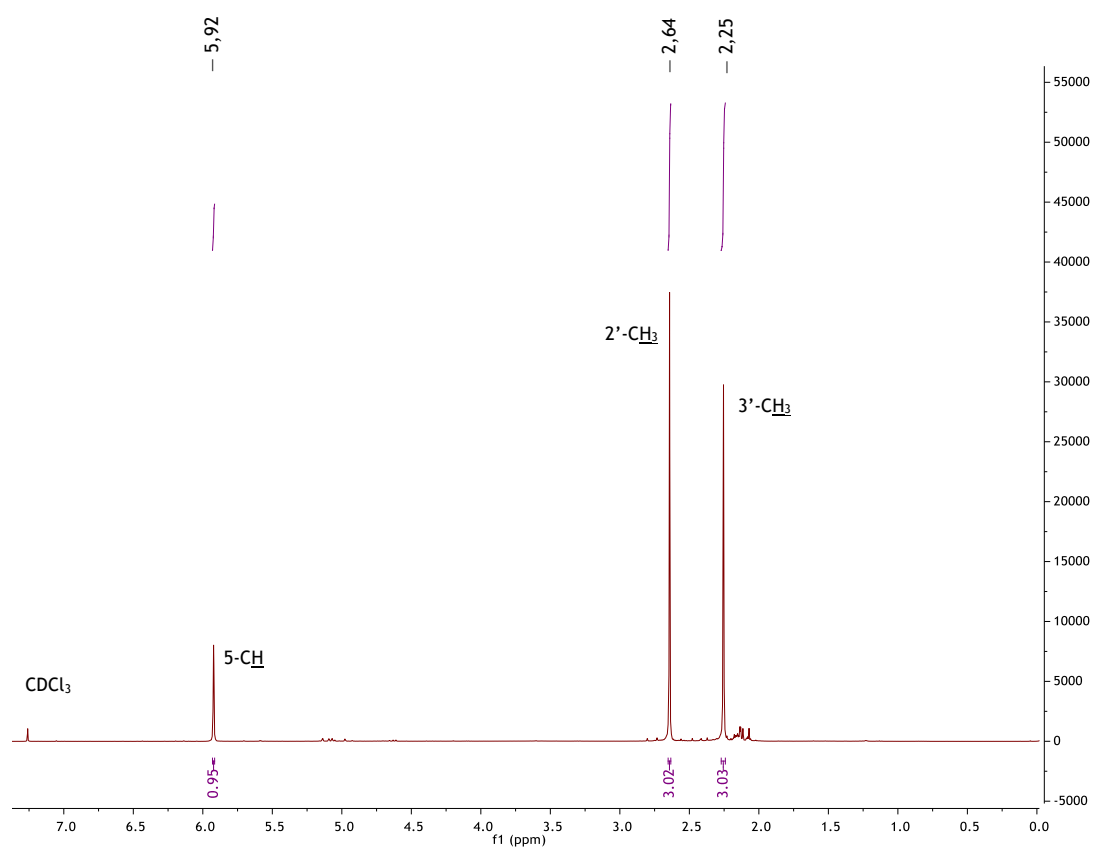
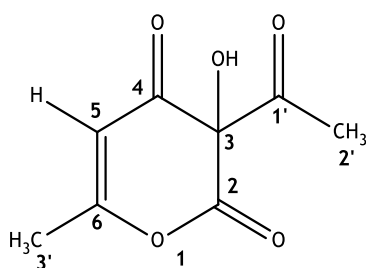
- [3] Lourenço, J.; Araújo, P. V.; Pereira, E. P.; Caraça, R.; Aguiar, C.; Carapeto, A.; Almeida, J. D.; Henriques, T. M. *Salix salviifolia* Brot. subsp. *salviifolia* - mapa de distribuição www.flora-on.pt/#wSalix+salviifolia+subsp.+salviifolia (accessed May 30, 2017)
- [4] Martins, N.V.D.F. Bioprospecção de Plantas: Obtenção de Extratos de Cascas de *Salix Salviifolia*, Project presented to the Universidade da Beira Interior to obtain the degree of BSc in Medicinal Chemistry, 2014.
- [5] Luís, Â. Avaliação das actividades antioxidante e anti-Microbiana de extractos de resíduos florestais. Dissertation presented to the Universidade da Beira Interior to obtain a Master's Degree in Biochemistry, 2009.
- [6] Miliauskas, G.; Venskutonis, P. R.; Van Beek, T. A. Screening of Radical Scavenging Activity of Some Medicinal and Aromatic Plant Extracts. *Food Chem.* 2004, 85 (2), 231-237.
- [7] Tawaha, K.; Alali, F. Q.; Gharaibeh, M.; Mohammad, M.; El-Elmat, T. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Selected Jordanian Plant Species. *Food Chem.* 2007, 104 (4), 1372-1378.
- [8] Pourmorad, F.; Hosseinimehr, S. J.; Shahabimajd, N. Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of Some Selected Iranian Medicinal Plants. *African J. Biotechnol.* 2006, 5 (June), 1142-1145.
- [9] Scherer, R.; Godoy, H. T. Antioxidant Activity Index (AAI) by the 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Method. *Food Chem.* 2009, 112 (3), 654-658.
- [10] Broinizi, P. R. B.; de Andrade-Wartha, E. R. S.; Silva, A. M. D. O.; Novoa, A. J. V.; Torres, R. P.; Azeredo, H. M. C.; Alves, R. E.; Mancini-Filho, J. Avaliação Da Atividade Antioxidante Dos Compostos Fenólicos Naturalmente Presentes Em Subprodutos Do Pseudofruto de Caju (*Anacardium Occidentale* L.). *Ciência e Tecnol. Aliment.* 2007, 27 (4), 902-908.
- [11] Marco, G. J. A Rapid Method for Evaluation of Antioxidants. *J. Am. oil Chem. Soc.* 1968, 45 (9), 594-598.

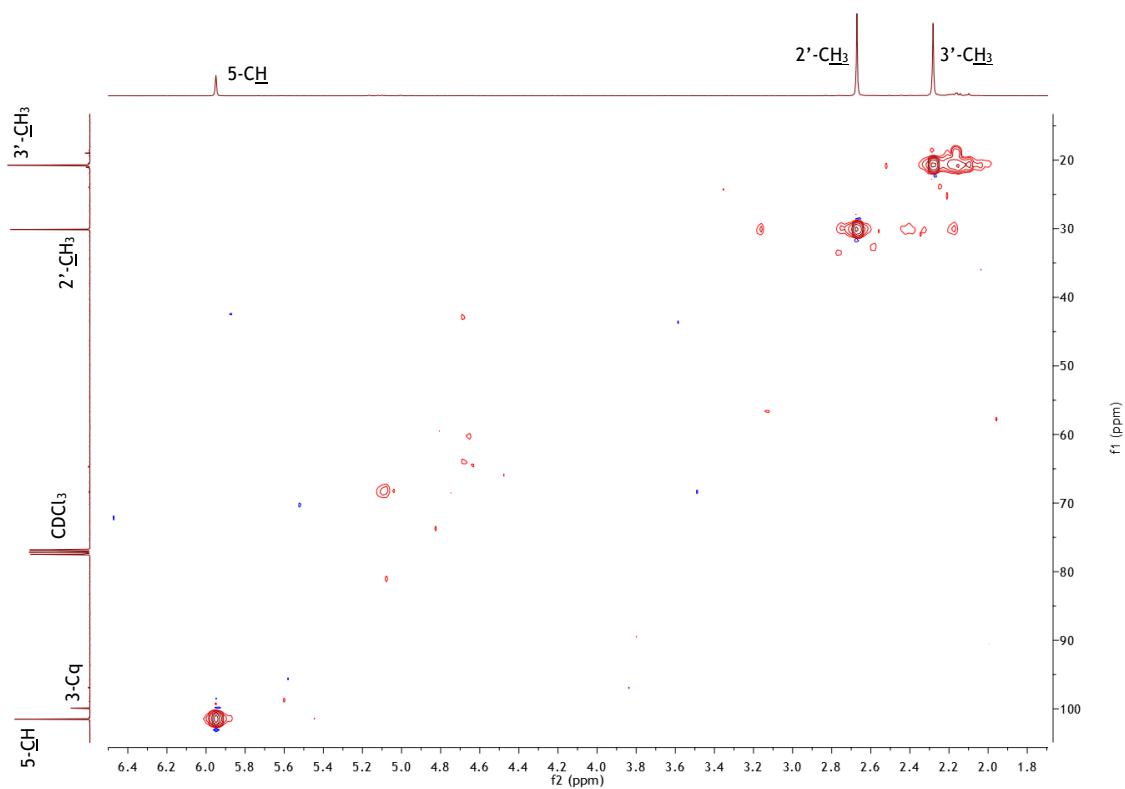
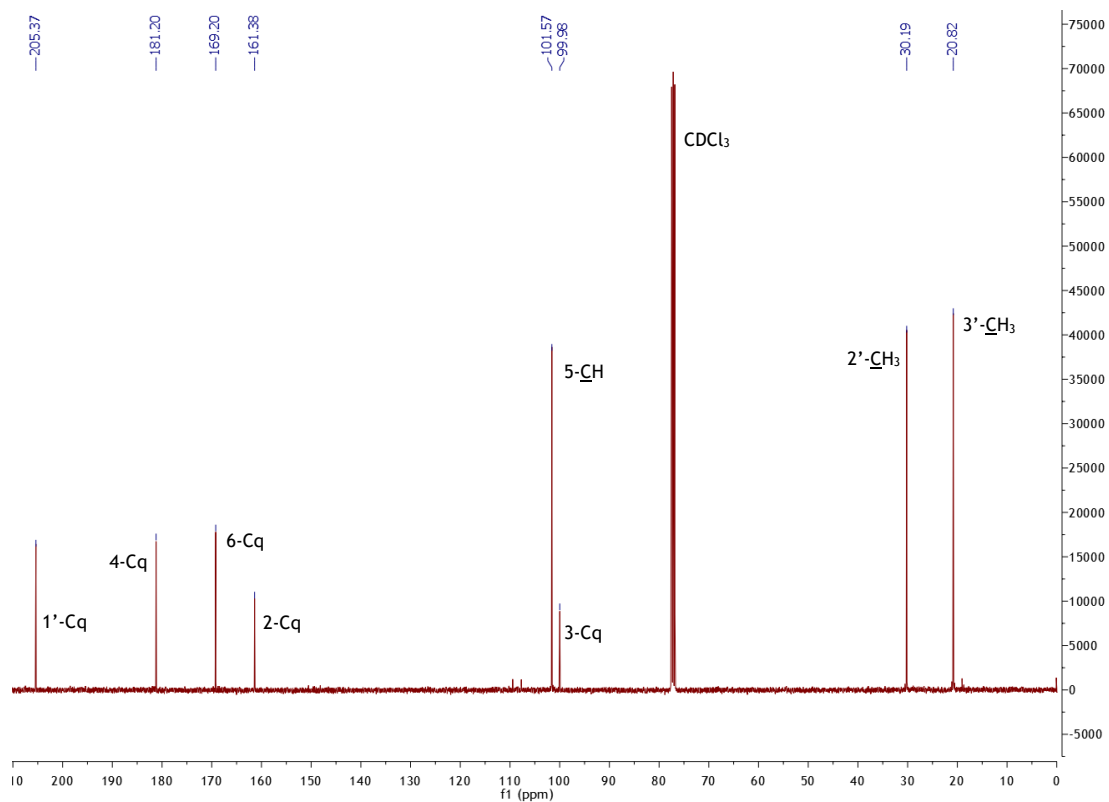
Anexos

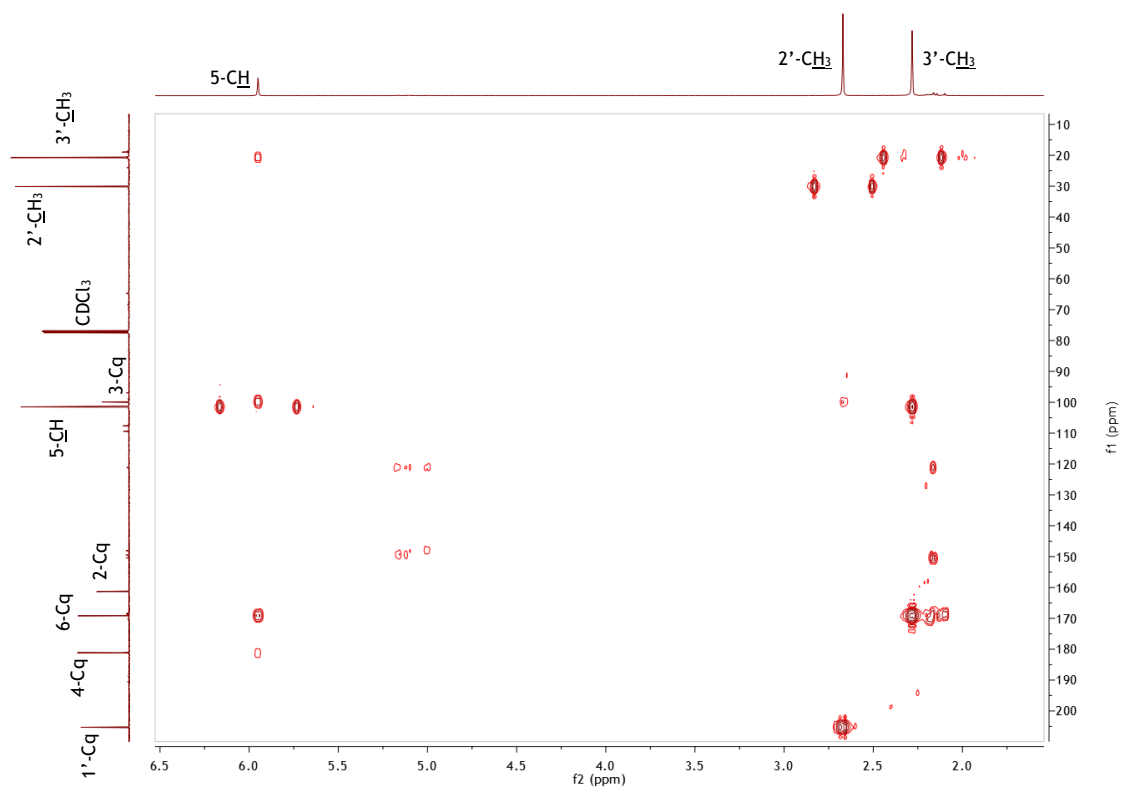
Anexo I - Espetros de RMN

No ponto 3.1.6. do capítulo 3, foram identificados estruturalmente três compostos, que se encontravam presentes nas frações recolhidas da CC da Acetilação II. Os espectros que permitiram essa identificação serão apresentados neste anexo.

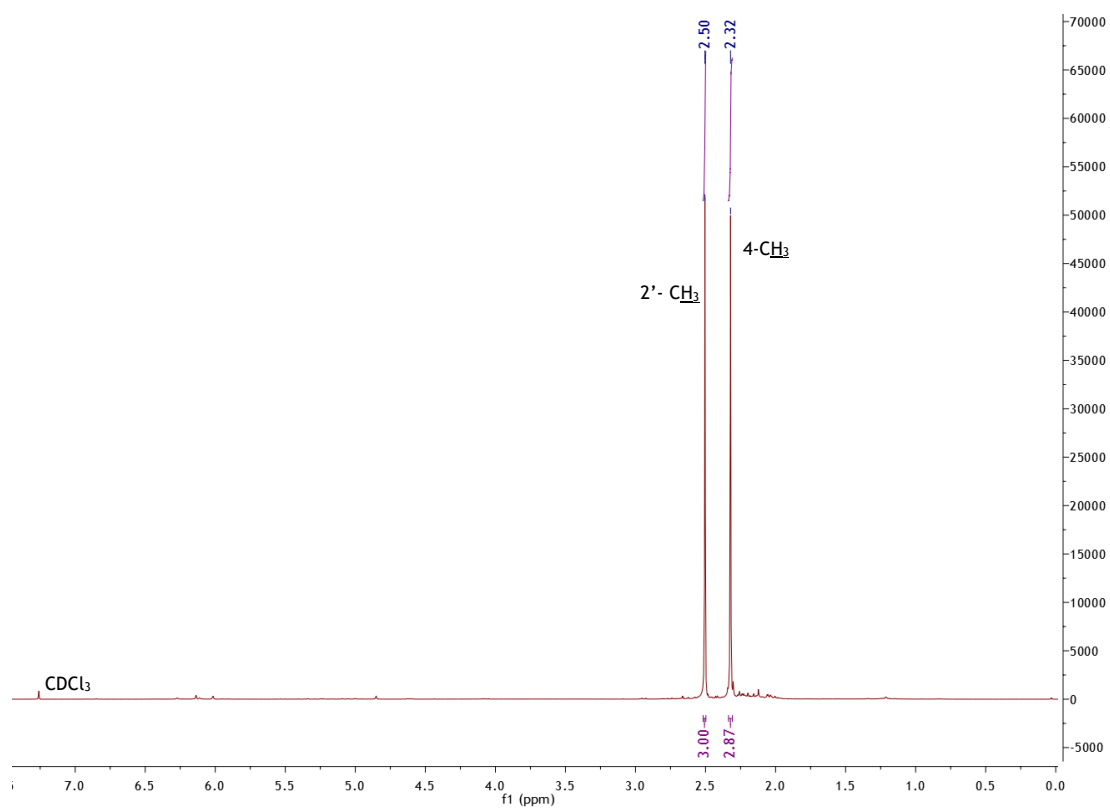
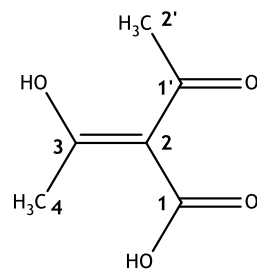
I.1. 3-Acetil-3-hidroxi-6-metil-piran-2,4-diona: RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e correlações HSQC e HMBC

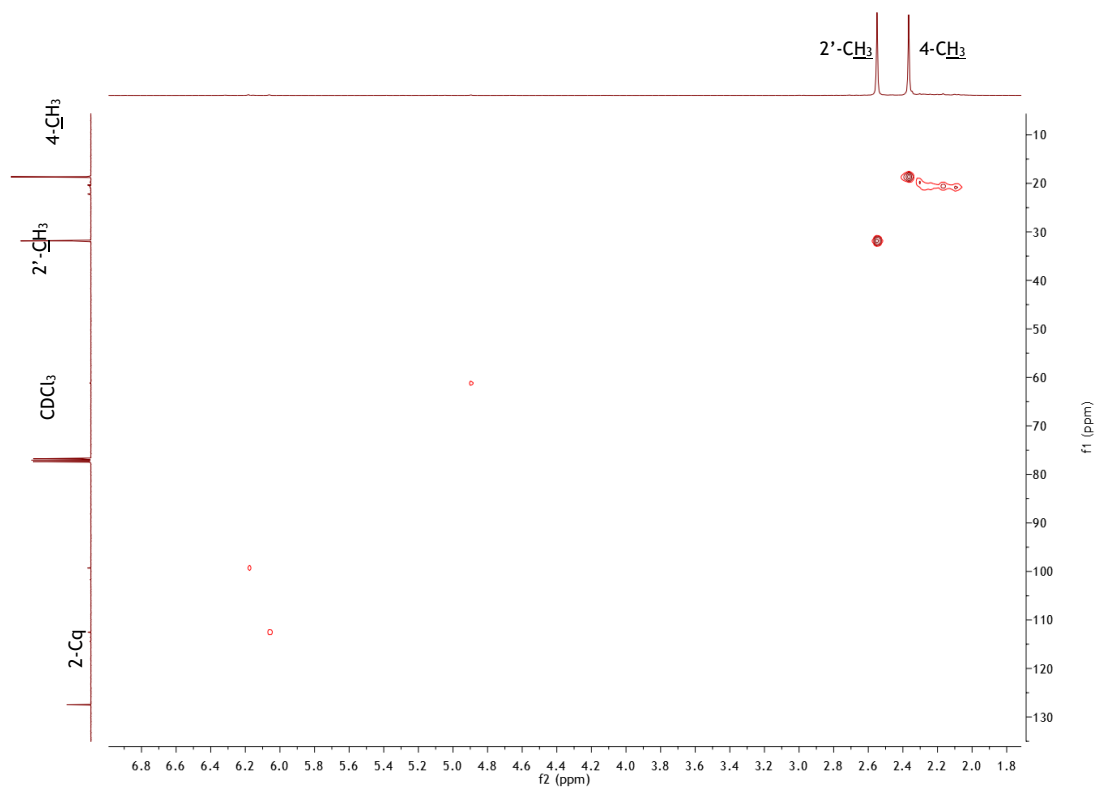
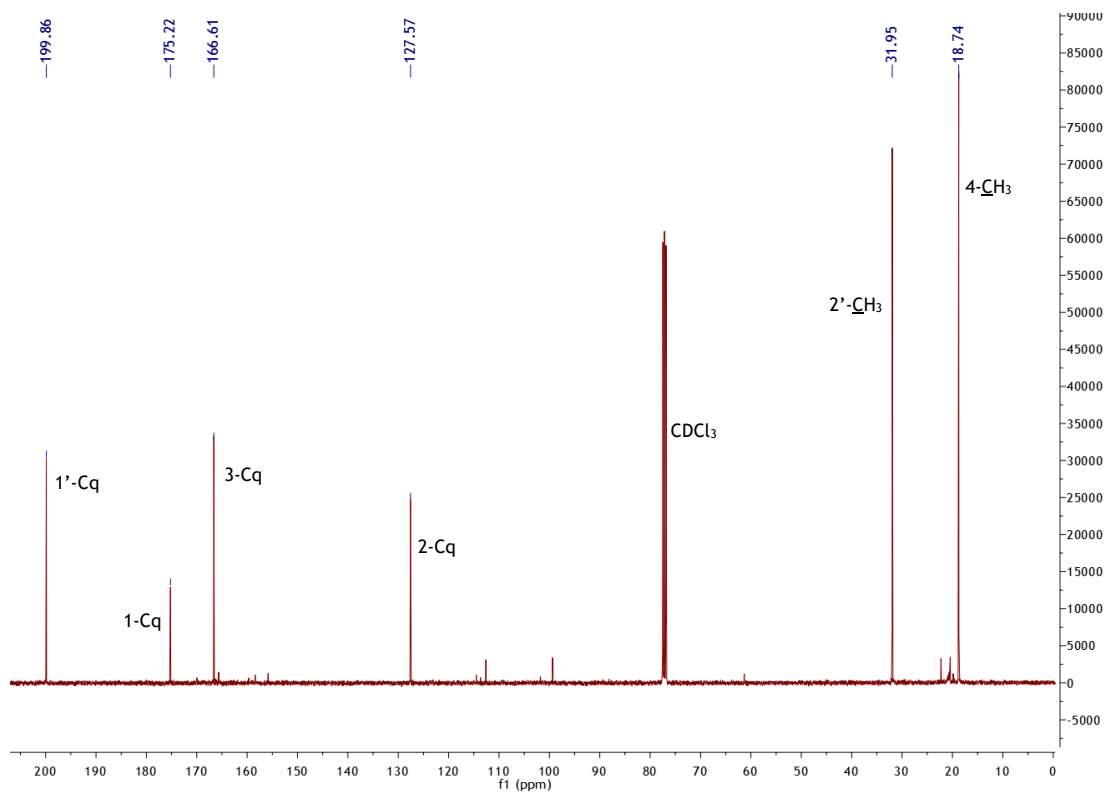


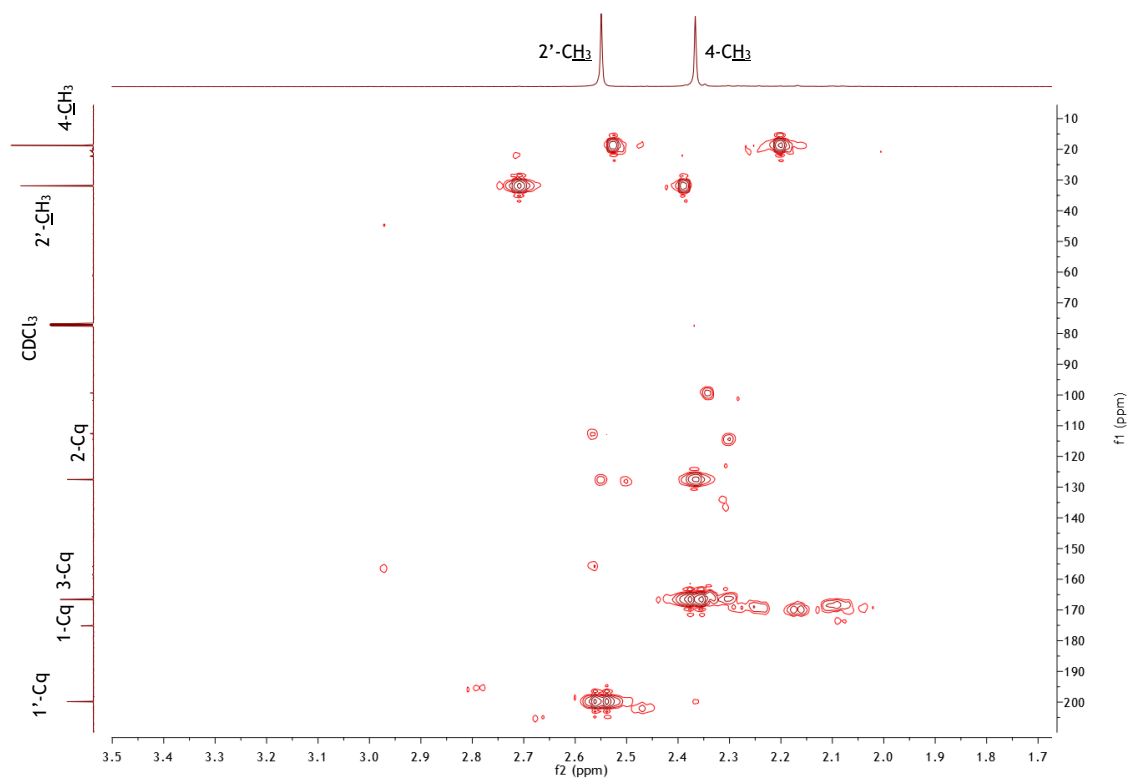




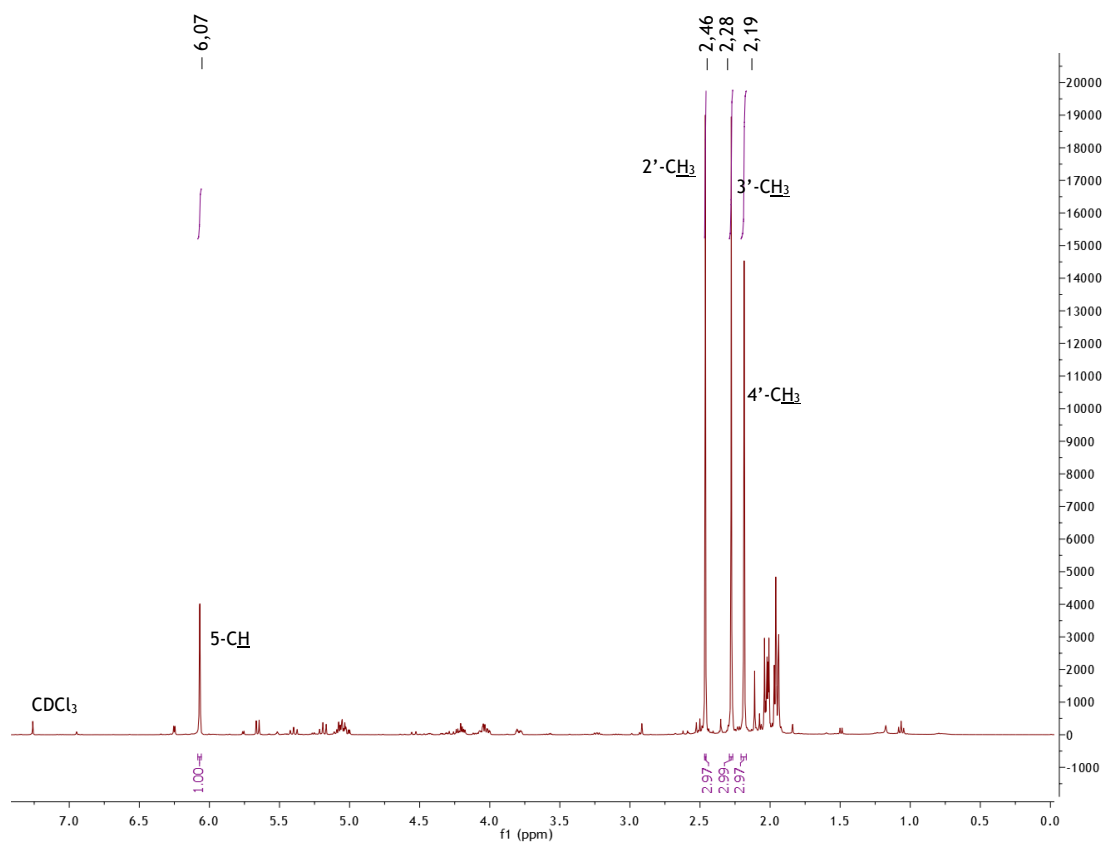
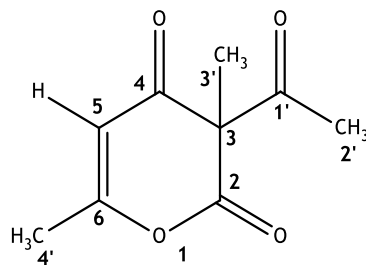
I.II. Ácido (*E*)-2-acetil-3-hidroxi-2-butenoico: RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e correlações HSQC e HMBC

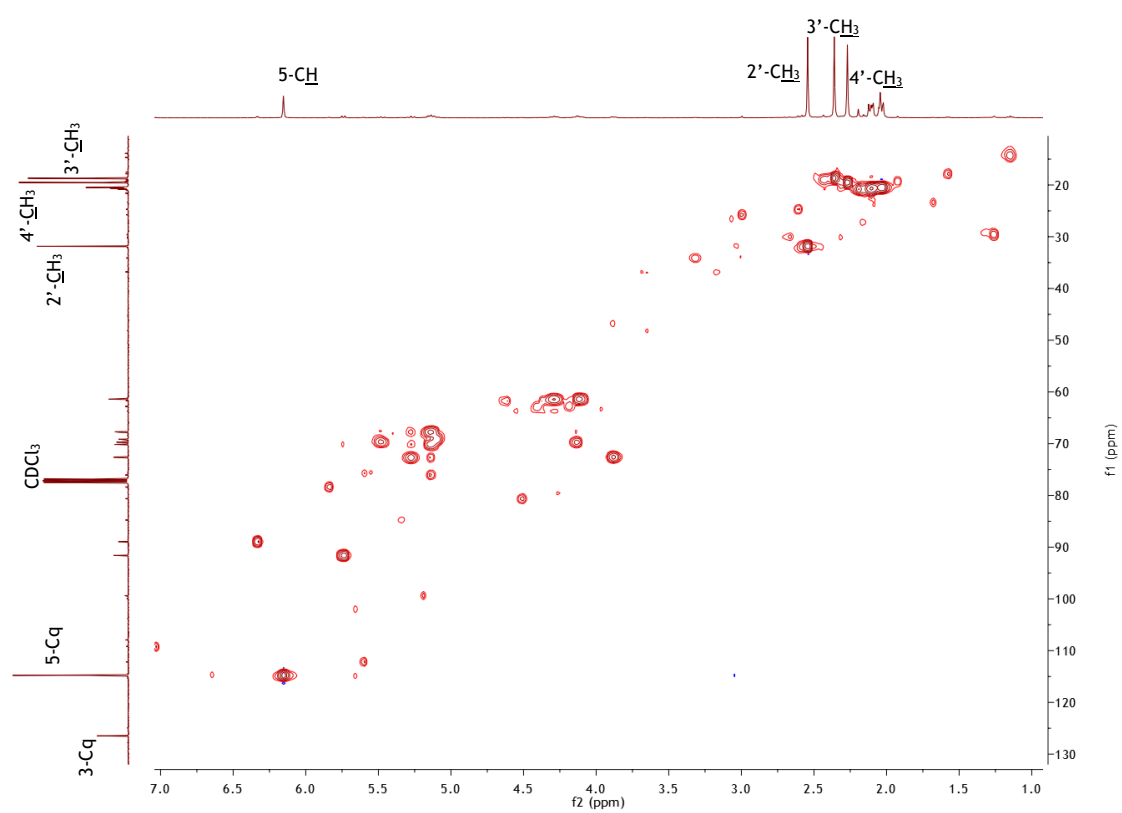
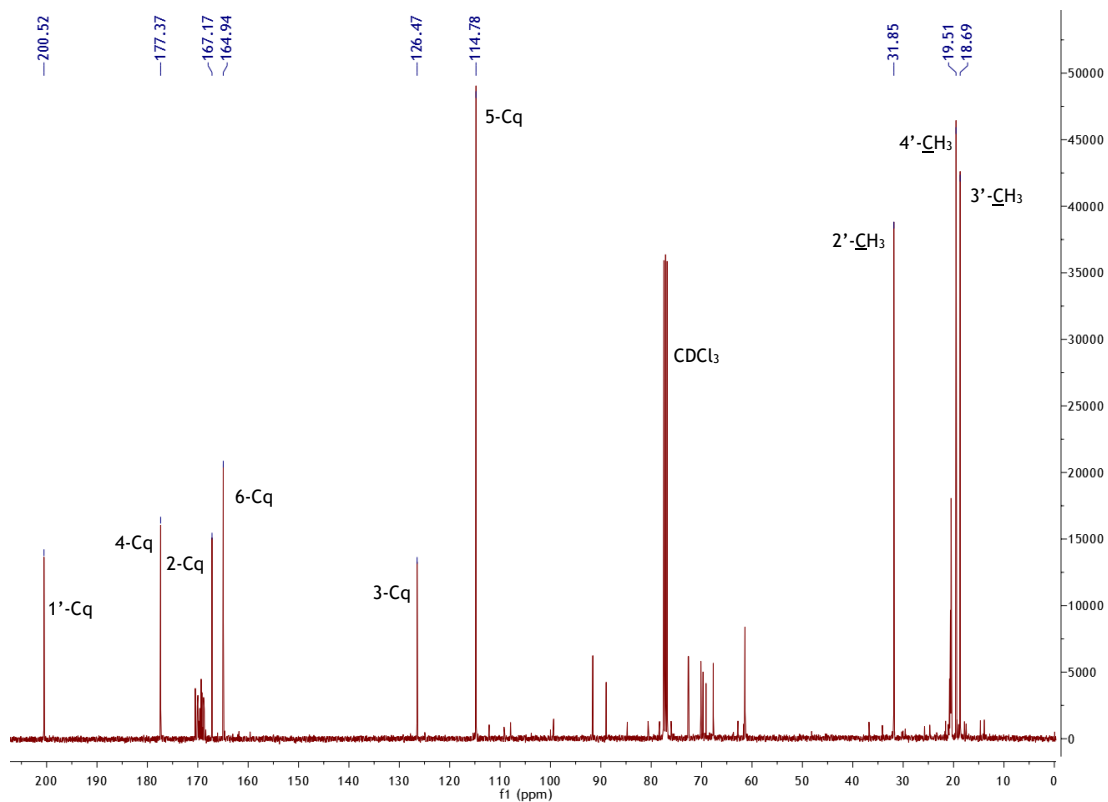


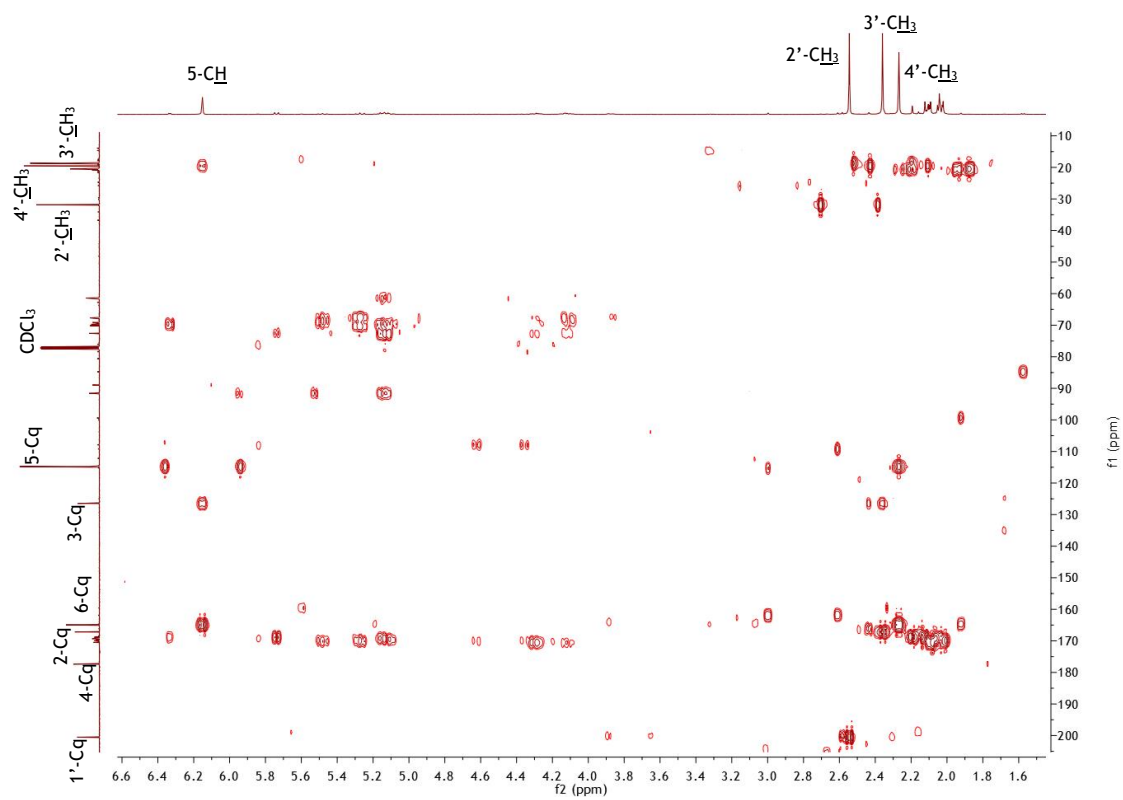




I.III. 3-Acetil-3,6-dimetil-piran-2,4-diona: RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e correlações HSQC e HMBC







Anexo II - Atividade antioxidante - Método do DPPH

No ponto 3.3.1. do capítulo 3, apenas foram apresentados os cálculos dos parâmetros da atividade antioxidante para o extrato etanol/água. Os dados referentes aos padrões serão apresentados neste anexo.

II.I. Rutina

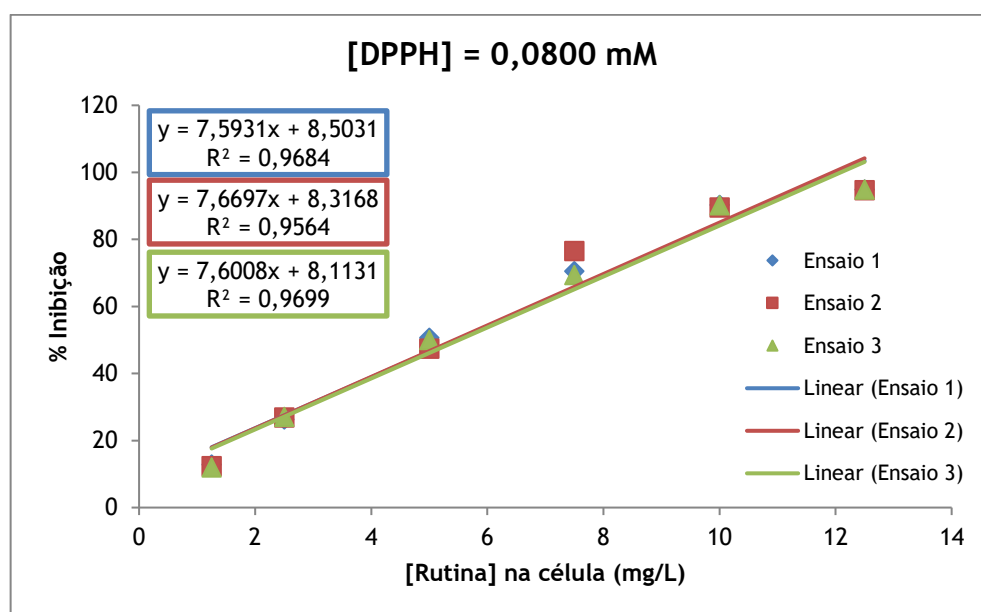


Figura 24 Representação gráfica da % I em função da concentração do padrão rutina na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.

Tabela 27 Parâmetros IC_{50} e AAI da rutina, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média ± Desvio Padrão
IC_{50} (µg/mL)	5,5	5,4	5,5	5,5 ± 0,1
AAI	5,5	5,5	5,4	5,5 ± 0,1

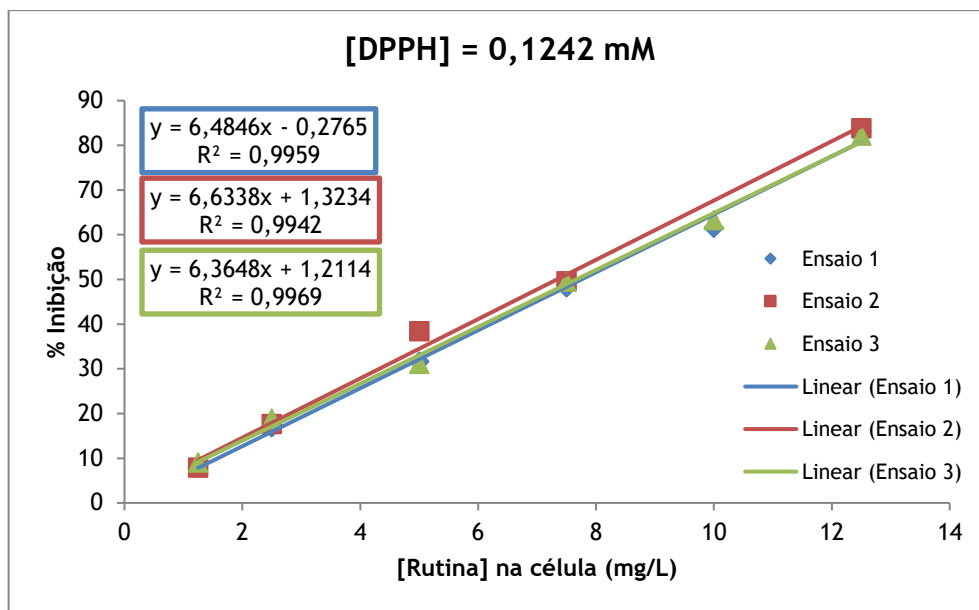


Figura 25 Representação gráfica da % I em função da concentração do padrão rutina na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,1242 mM.

Tabela 28 Parâmetros IC_{50} e AAI da rutina, para a concentração de DPPH de 0,1242 mM.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média \pm Desvio Padrão
IC_{50} (μ g/mL)	7,8	7,3	7,7	7,6 \pm 0,2
AAI	6,0	6,3	6,1	6,1 \pm 0,2

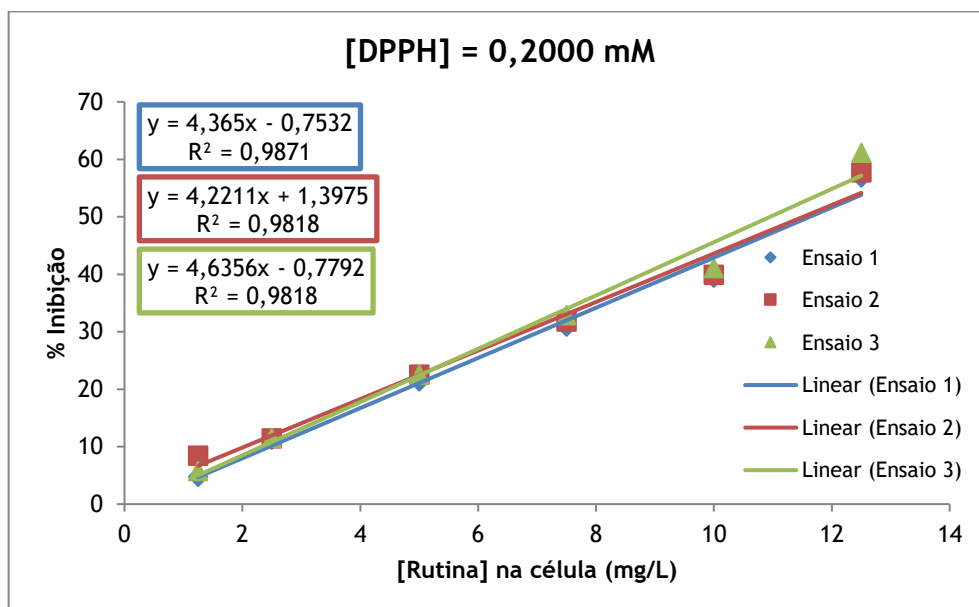


Figura 26 Representação gráfica da % I em função da concentração do padrão rutina na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,2000 mM.

Tabela 29 Parâmetros IC₅₀ e AAI da rutina, para a concentração de DPPH de 0,2000 mM.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média ± Desvio Padrão
IC ₅₀ (µg/mL)	11,6	11,5	11,0	11,4 ± 0,4
AAI	6,4	6,4	6,8	6,5 ± 0,2

Tabela 30 Resumo dos parâmetros IC₅₀ e AAI e classificação da atividade antioxidante da rutina.

	Média ± Desvio Médio	Atividade antioxidante
IC ₅₀ (µg/mL)	8,1 ± 2,1	Muito Forte
AAI	6,0 ± 0,4	

Para promover 50% de inibição é necessária uma concentração de 8,1 µg/mL de rutina. A rutina apresenta uma capacidade antioxidante muito forte, segundo o AAI.

II.II. Trolox

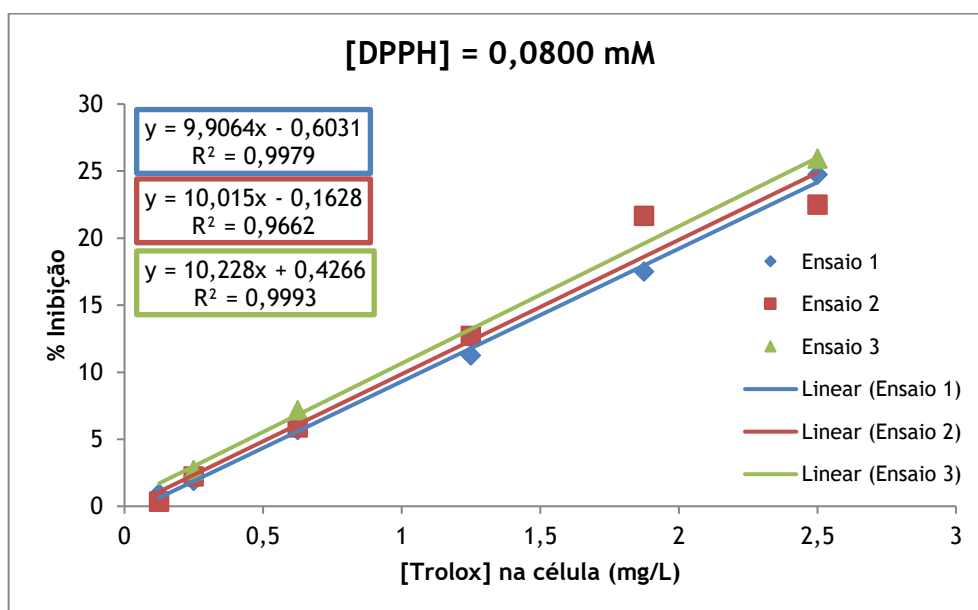


Figura 27 Representação gráfica da % I em função da concentração do padrão trolox na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.

Tabela 31 Parâmetros IC₅₀ e AAI do trolox, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média ± Desvio Padrão
IC ₅₀ (µg/mL)	5,1	5,0	4,8	5,0 ± 0,1
AAI	5,8	6,0	6,2	6,0 ± 0,2

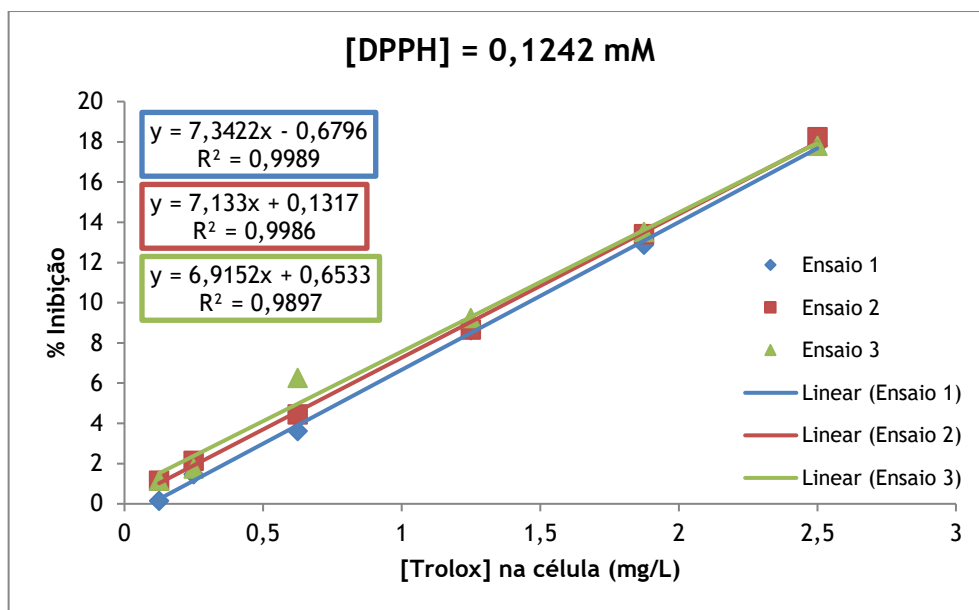


Figura 28 Representação gráfica da % I em função da concentração do padrão trolox na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,1242 mM.

Tabela 32 Parâmetros IC₅₀ e AAI do trolox, para a concentração de DPPH de 0,1242 mM.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média ± Desvio Padrão
IC ₅₀ (µg/mL)	6,9	7,0	7,1	7,0 ± 0,1
AAI	6,6	6,6	6,4	6,6 ± 0,1

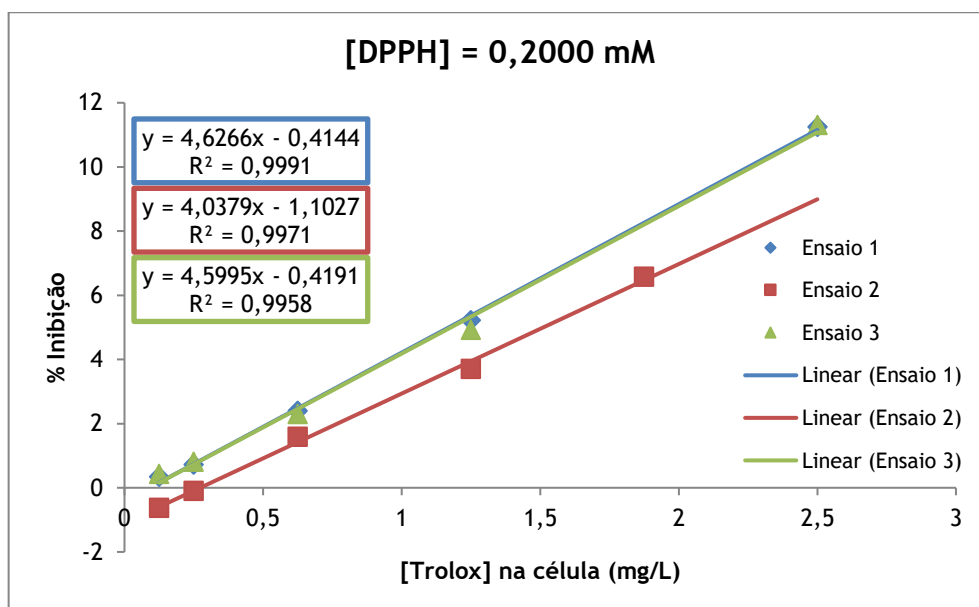


Figura 29 Representação gráfica da % I em função da concentração do padrão trolox na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,2000 mM.

Tabela 33 Parâmetros IC₅₀ e AAI do trolox, para a concentração de DPPH de 0,2000 mM.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média ± Desvio Padrão
IC ₅₀ (µg/mL)	11,6	11,5	11,0	11,4 ± 0,4
AAI	6,4	6,4	6,8	6,5 ± 0,2

Tabela 34 Resumo dos parâmetros IC₅₀ e AAI e classificação da atividade antioxidante do trolox.

	Média ± Desvio Médio	Atividade antioxidante
IC ₅₀ (µg/mL)	7,8 ± 2,4	Muito Forte
AAI	6,3 ± 0,2	

Para promover 50% de inibição é necessária uma concentração de 7,8 µg/mL de trolox. O trolox apresenta uma capacidade antioxidante muito forte, segundo o AAI.

II.III. Ácido Gálico

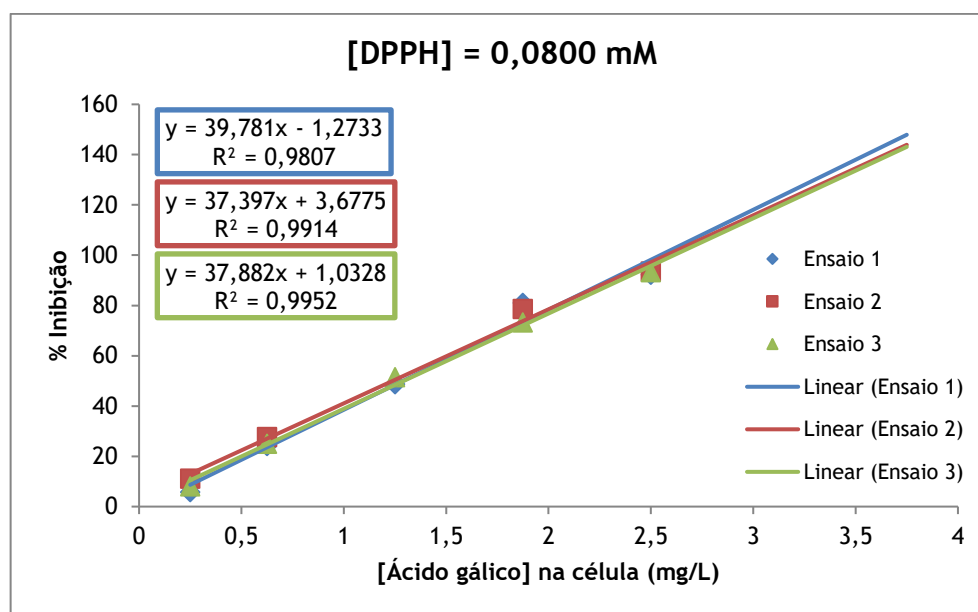


Figura 30 Representação gráfica da % I em função da concentração do padrão ácido gálico na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.

Tabela 35 Parâmetros IC₅₀ e AAI do ácido gálico, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média ± Desvio Padrão
IC ₅₀ (µg/mL)	1,3	1,2	1,3	1,3 ± 0,1
AAI	21,7	23,4	20,4	21,8 ± 1,5

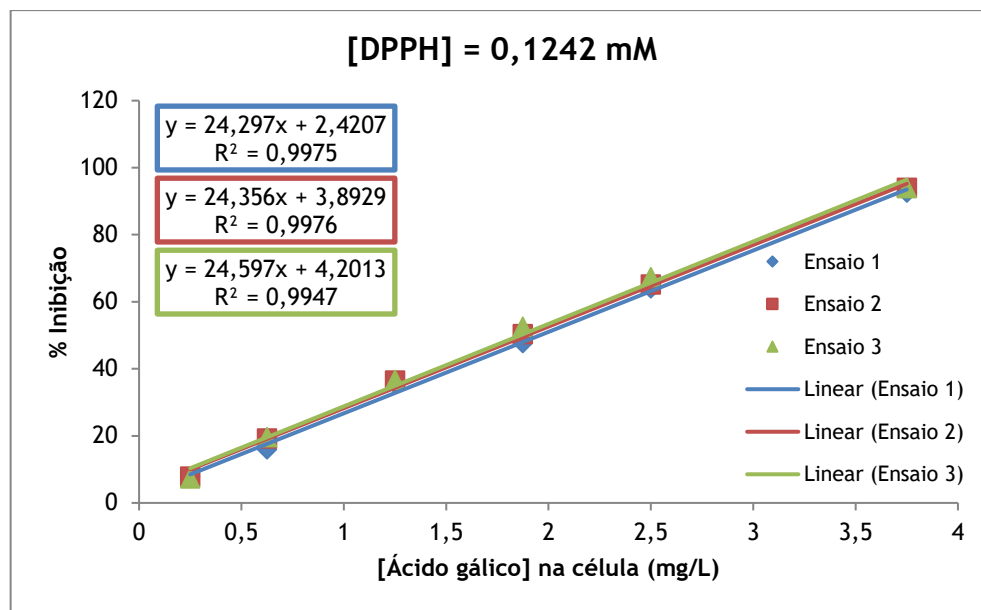


Figura 31 Representação gráfica da % I em função da concentração do padrão ácido gálico na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,1242 mM.

Tabela 36 Parâmetros IC_{50} e AAI do ácido gálico, para a concentração de DPPH de 0,1242 mM.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média \pm Desvio Padrão
IC_{50} (μ g/mL)	2,0	1,9	1,9	1,9 \pm 0,1
AAI	23,7	24,6	25,0	24,4 \pm 0,7

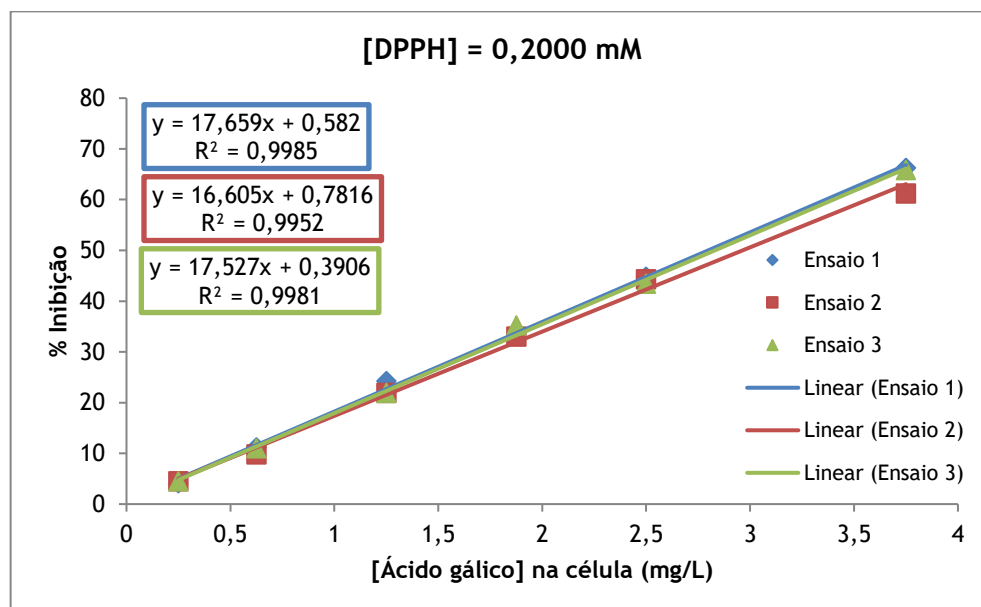


Figura 32 Representação gráfica da % I em função da concentração do padrão ácido gálico na célula do espectrofotômetro, para a concentração de DPPH de 0,2000 mM.

Tabela 37 Parâmetros IC₅₀ e AAI do ácido gálico, para a concentração de DPPH de 0,2000 mM.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média ± Desvio Padrão
IC ₅₀ (µg/mL)	2,8	3,0	2,8	2,9 ± 0,1
AAI	26,2	24,2	25,9	25,4 ± 1,1

Tabela 38 Resumo dos parâmetros IC₅₀ e AAI e classificação da atividade antioxidante do ácido gálico.

	Média ± Desvio Médio	Atividade antioxidante
IC ₅₀ (µg/mL)	2,0 ± 0,6	Muito Forte
AAI	23,9 ± 1,4	

Para promover 50% de inibição é necessária uma concentração de 2,0 µg/mL de ácido gálico. O ácido gálico apresenta uma capacidade antioxidante muito forte, segundo o AAI.